

THESIS

MUNICH

1960

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ABTRENNBARKEIT DES
LIPIDANTEILS DER SERUMLIPOPROTEIDE DURCH
HYDROPHOBE ORGANISCHE LÖSUNGSMITTEL

Joachim Stempel

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR PROPHYLAXE DER KREISLAUFKRANKHEITEN
BEI DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. med. G. SCHIMERT

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ABTRENNBARKEIT DES LIPOIDANTEILS
DER SERUMLIPOPROTEIDE DURCH HYDROPHOBE ORGANISCHE
LÖSUNGSMITTEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Joachim S t r e m p e l
aus Trier

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. med. G. SCHIMERT
Mitberichterstatter:	Dr. med. H. SCHWALB
Dekan:	Professor Dr. med. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 12. 1966

INHALT

	Seite
I. EINLEITUNG	5
1) Zur Pathogenese der Arteriosklerose	5
2) Zur Chemie der Lipoproteide des Blutserums	5
3) Literatur zur Frage der Bindung und Bindungsstabilität innerhalb des Lipoproteidkomplexes	7
4) Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit	10
II. Extraktion der Lipoide durch Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther	
1) Beschreibung der Veränderungen des Serums beim Ausschütteln	12
2) Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther im Verhältnis 1 : 1	13
a) Methodik	13
b) Ergebnisse	15
3) Ergänzenden Fettbelastungstest	17
a) Methodik	17
b) Ergebnisse	17
4) Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther im Verhältnis 1 : 20	18
a) Methodik	18
b) Ergebnisse	18
5) Diskussion	19
III. Elution der Lipoide aus elektrophoretisch getrennten	25
1) Grundlagen	25
2) Methodik	29
3) Ergebnisse	31
4) Diskussion	34
IV. Zusammenfassung	37
V. Tabellen und Diagramme	39
VI. Literaturverzeichnis	73

I. EINLEITUNG

1) Zur Pathogenese der Arteriosklerose

Seitdem es gelungen ist, die Infektionskrankheiten immer wirksamer zu bekämpfen, rückt - zusammen mit den malignen Tumoren - die Arteriosklerose als allgemeines Problem immer mehr in den Vordergrund. Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung der Arterienwand sind noch weitgehend unklar. Wir kennen die verschiedenen pathologisch-anatomischen Bilder, die sie kennzeichnen, und wir kennen eine Reihe von Faktoren, die an ihrer Entstehung beteiligt sind. Sie brauchen hier im einzelnen nicht diskutiert zu werden.

Besonderes Interesse findet in diesem Zusammenhang die Untersuchung physikochemischer Veränderungen einmal der Gefäßwandbausteine, zum anderen des Blutplasmas, das die Wand umspült. Das Synonym "Atherosklerose", das nach einem Vorschlag von Marchand heute vielfach für "Arteriosklerose" gebraucht wird, soll ausdrücken, daß für das anatomische Bild charakteristisch sind die atheromartige Einlagerung von Lipoiden in die Intima und die angrenzenden Schichten der Arterienwand und die dadurch bedingte Sklerosierung. Gleichzeitig oder nachfolgend sehen wir dann Calciumablagerung in diesen Herden, wobei Fettsäuren als Kalkfänger wirken (25). Die eingelagerten Lipide entstammen dem Blutplasma (29). Es liegt also nahe, zu fragen, inwieweit Erhöhungen des Blutlipoidspiegels zur Entstehung der Arteriosklerose beitragen, zum anderen, ob Änderungen in der chemischen Beschaffenheit des Serums als Ursachen nachweisbar sind. Wir wissen, daß arteriosklerotische Bilder bei einigen Erkrankungen bevorzugt auftreten, die mit einer Erhöhung des Serumlipoidspiegels einhergehen, so bei Diabetes mellitus oder der xanthomatösen Hypercholesterinämie. In etwa 60 % aller anderen Arterioskleroseanfälle lassen sich Erhöhungen des Serumcholesterins oder eine durch Insuffizienz des Klärsystems bedingte Verlängerung der alimentären Hyperlipämie nachweisen (25). Dem steht nun gegenüber, daß wir eine ausgedehnte Arteriosklerose auch finden, wenn keine dieser Störungen vorliegt. Hier setzt die Untersuchung über die Molekülstruktur der Lipoproteide an.

2) Zur Chemie der Lipoproteide des Blutserums

Unter physiologischen Bedingungen sind im menschlichen Serum etwa 0,5 - 1 % Lipide klar gelöst. Es sind dies freies Cholesterin, Ester des Cholesterins mit höheren Fettsäuren, freie unveresterte Fettsäuren, Neutralfette und Phospholipide. Sie werden im Serum, einem wässrigen lipophoben Milieu, durch Verbindung

mit Eiweißkörpern in Lösung gehalten. Die grundlegenden Untersuchungen, die zum erstenmal auf eine solche Verbindung zwischen Eiweiß und Lipoiden hinwiesen, wurden von Nerking (44) und Macheboeuf (40) durchgeführt. Heute wird es, vor allem nach den Arbeiten von Cohn und Mitarbeitern (12) sowie Cofman und Mitarbeitern (21, 22, 37), allgemein als gesichert angesehen, daß diese Komplexe, Lipoproteide genannt, wohldefinierte Einheiten mit spezifischer Proteinkomponente sind. Es liegen auch elektronenmikroskopische Aufnahmen solcher "Übermoleküle" (giant molecules) vor (27).

Die Lipoproteide sind nicht eine homogene Fraktion, sondern nach Protein- wie nach Lipoidanteil durchaus unterschiedlich. Zur Darstellung gleichartiger Gruppen dieser Substanzen werden mehrere Verfahren angewendet; es sind hauptsächlich die Auftrennung in der Ultrazentrifuge, die Äthanolfraktionierung nach Cohn und die Elektrophorese auf Papier oder Stärkegel. Die Trennung in der Ultrazentrifuge geht von der verschiedenen Dichte, die Äthanolfraktionierung von dem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten und die Elektrophorese von der unterschiedlichen elektrischen Ladung der Partikel aus. Die mit diesen Techniken gewonnenen, hinsichtlich ihres jeweiligen Verhaltens homogenen Fraktionen lassen sich nicht ohne Einschränkung miteinander vergleichen. In der Ultrazentrifuge stellen wir vor allem zwei große Klassen von Lipoproteiden dar: solche hoher und solche niederer Dichte ("High" bzw. "low density lipoproteins"). Es entsprechen den Lipoproteiden hoher Dichte im wesentlichen die Cohn-Fraktionen IV, V und VI und die sogenannten α -Lipoproteide der Elektrophorese, den Lipoproteiden niederer Dichte die Cohn-Fraktionen I, II und III und die sogenannten β -Lipoproteide (49).

Der Eiweißanteil einer jeden Fraktion wird von Globulinen gestellt. Sie machen etwa 10 - 11 % der gesamten Plasmaproteine aus. In der Eiweißelektrophorese wandern sie im Bereich der α_1 - und β -Globuline, in geringerem Maße im Bereich der α_2 - und γ -Globuline (49). Ob der Lipoidanteil zwischen den Fraktionen der Trägerproteine weitgehend austauschbar (18, 31) oder ob der Proteinanteil hochspezifisch ist (43), muß noch offen bleiben. Die Festigkeit der Bindung zwischen Lipoid und Protein kann nur begrenzt sein, da der Lipoidanteil an benachbarte Medien leicht abgegeben wird (23, 63). Die Phospholipide des Serums verhalten sich im Stoffwechsel so, als seien sie nicht an Protein gebunden. Das Plasmacholesterin wird in vitro rasch in die Erythrozytenmembran aufgenommen und ebenso wieder abgegeben (2). Die Lipoproteide sind keine über längere Zeit stabilen Moleküle. Sie verschwinden auch mehr oder weniger rasch aus dem Serum; aus Lipoproteiden niederer Dichte entstehen schrittweise solche höherer Dichte; gleichzeitig werden Bestandteile der Neutralfette zu Phospholipoiden und Cholesterinestern umgebaut; je mehr sich dabei die Umwandlung den Klassen höherer Dichte nähert, um so langsamer verschwinden die Moleküle aus dem Serum (54). Die Untersuchung der Lipoproteide wird dadurch erschwert, daß bei allen Aufbereitungsvorgängen Veränderungen des sie umgebenden Milieus in Kauf

genommen werden müssen, wodurch neue, in vivo nicht existente Molekülaggregate entstehen können.

Von den anderen Plasmaeiweißkörpern unterscheiden sich die Lipoproteide zunächst durch ihre Dichte, die 980 - 1210 beträgt (gegenüber 1260 - 1380 bei den übrigen Proteiden). Die GröÖte der Partikel wird mit 200 Ångström bis 0,2 angegeben. Ob die Chylomikronen mit einer Dichte kleiner als 980 und einer GröÖe von 0,2 - 1,0 μ zu den Lipoproteiden zu rechnen sind, wird noch uneinheitlich beurteilt. Ihr Proteinanteil ist außerordentlich gering (2 %).

Je größer ein Lipoproteidpartikel ist, umso größer ist sein Lipoproteidgehalt, umgekehrt verhält sich der Proteinanteil. Auch sind die Lipoidbausteine unterschiedlich verteilt (Abb. 1, siehe hierzu auch Tab. I). Weiterhin unterscheiden sich die Lipoproteide von den übrigen Plasmaeiweißkörpern durch ihre Hydratation; durch Wasserentzug oder Gefriertrocknung werden sie denaturiert (49).

Wenn man diese Bestandteile auch im einzelnen recht genau analysieren konnte, so ist doch über ihren Zusammenhalt innerhalb der Molekülaggregate noch sehr wenig bekannt. Die größeren von niederer Dichte sind als Komplexe begrenzter Stabilität anzusehen. An der demgegenüber größeren Festigkeit der Fraktionen höherer Dichte ist ihr Wassergehalt maßgeblich beteiligt. Besonders Leipert (32) wies auf die Bedeutung der Hydratation hin. Für die Bindung des Wassers an die Proteine sind hauptsächlich die ionisierten Gruppen der Aminosäuren verantwortlich. Die Peptidbindungen ermöglichen die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken zwischen bestimmten Gruppen einzelner Hauptvalenzketten und damit die Aufrechterhaltung höherer Strukturformen (49). Primär sind wahrscheinlich die polaren Gruppen der ionisierten Fettsäuren und Phosphatide mit den dissoziierten Aminosäuregruppen der Peptide, insbesondere den Serin- und Threoninresten verbunden (17). Die Phosphatide sind sicher ein funktionell wichtiger Bestandteil; ebenso wie freies Cholesterin werden sie leichter mit Serum- und Gewebsbestandteilen ausgetauscht als die Cholesterinester und Neutralfette (2, 63). Die nicht ionisierten hydrophoben Triglyzeride und Cholesterinester können sich mit dem Proteinmolekül erst nach vorheriger Bindung an ein ionisiertes Lipoid verketten; dies geschieht wahrscheinlich mittels van-der-Waalscher Attraktionskräfte. Covalenzen dürften für den Zusammenhalt der Struktur keine Rolle spielen (47).

3) Literatur zur Frage der Bindung und Bindungsstabilität innerhalb des Lipoproteidkomplexes

Gibt es nun Veränderungen in der Qualität der Bindung zwischen Protein und Lipoid oder der Bindungen der einzelnen Lipoide untereinander, die dazu führen, daß die Ausfällung von Lipoiden in der Arterienwand begünstigt wird? Mit dieser Frage haben sich viele Autoren beschäftigt. Seit McFarlane (42) zeigte, daß durch

einfaches Ausschütteln des Serums mit Äthyläther nach Einfrieren aus hyperlipämischen und Seren von Nephrosepatienten ein prozentual wesentlich höherer Anteil an Lipoiden extrahiert werden kann als dies normalerweise möglich ist. Man glaubte, aus dem Befund schließen zu dürfen, daß in solchen pathologischen Seren die Bindungsstabilität zwischen Lipoid und Protein herabgesetzt sei. Der Austausch von Lipoiden zwischen dem Protein und dem milden lipophilen Lösungsmittel, das sich nicht mit dem Serum vermischt, wäre demnach ein Verteilungsvorgang, der nur von der jeweiligen Affinität bestimmt wird. Ist die Bindung innerhalb des Lipoproteidkomplexes stark, so wird wenig Lipoid in das Lösungsmittel übergeben. Ist sie schwach, mehr. McFarlane nahm an, daß die Proteinkomponente dabei unbeschädigt bleibe und sogar eine gewisse Rückbindungskapazität für Lipoiden behalte.

Daß ein großer Teil der Lipoiden aus dem Lipoproteidmolekül abgetrennt werden kann, ohne daß dabei das Protein denaturiert wird, war schon aus den Versuchen von Blix (8) zu entnehmen. Er hatte das gesamte Cholesterin und etwa 75 % der Phospholipoiden durch Behandlung des Serums mit Aceton und Aceton-Äther extrahiert, den Eiweißniederschlag in einer Pufferlösung aufgenommen und elektrophoretisch untersucht; die Mobilität aller Fraktionen blieb dabei erhalten.

Ähnliche Ergebnisse berichten andere Autoren, die eine Lipoidextraktion durch Ausschütteln mit Äthyläther vorgenommen hatten (11, 15, 64).

Avigan (4) trennte zunächst Lipoproteide hoher und solche niederer Dichte durch Ultrazentrifugation von den anderen Eiweißfraktionen ab und extrahierte dann die Lipoiden mit Äthyläther. Aus der Lipoproteidklasse niederer Dichte konnte er ebenfalls das Cholesterin fast völlig, die Phospholipoiden nur in geringer Menge, aus der Klasse hoher Dichte von beiden nur geringe Mengen entfernen. Die zurückbleibenden Anteile bewahrten sowohl die immunochemische Reaktion wie die Rückbindungsfähigkeit für Lipoiden.

Scanu (50) untersuchte das durch Ultrazentrifugation und Ätherextraktion der Lipoiden gewonnene α_1 -Lipoprotein-Protein, das die Mobilität in der Elektrophorese beibehält und die gleiche immunochemischen Eigenschaften wie das intakte α_1 -Lipoprotein zeigte.

Es soll im allgemeinen gleichgültig sein, mit welchem lipophilen Lösungsmittel die Extraktion durchgeführt wird. Die quantitative Abtrennung der Lipoiden ist nach Zöllner und Mitarbeitern (62, 64) auch mit Triolein möglich, wenn der Vorgang oft genug wiederholt wird.

Eine möglichst schonende Abtrennung der Lipoiden soll durch die Verwendung moderner Kunstharz-Ionenaustauscher gewährleistet sein. Nikkilä und Mitarbeiter (46) prüften den Effekt des von Hansen (26) entwickelten Bentonites auf die Serumlipoproteide. Sie fanden, daß die Lipoiden durch Bentonite ohne Zerstörung des Proteins abgelöst

werden können. Allerdings ging der spezifische immunochemische Effekt dabei verloren. Ihre Ergebnisse wurden von Schleiffarth und Mitarbeitern (53) kritisiert, die feststellten, daß eine Lipoidabtrennung bei dieser Technik nur in geringem Maße erfolgt, daß aber eine große Menge an Lipoproteiden an das Kunstharz absorbiert wird, wodurch sich der Verlust der immunologischen Reagibilität erklärt.

Auf dem Prinzip des Ionenaustausches basiert auch die Versuchsanordnung Houssets (28), der dem Serum ein anionisches Detergens (Aryl-alkyl-sulfonat) zuffügte, die Mischung 30 Minuten stehen ließ, dann auf ein Papier auftrug, trocknete und schließlich mit Chloroform eluierte. Es ging ein hoher Prozentsatz an Cholesterin in das Chloroform über. Der Autor nahm an, daß die negativen Lipoidgruppen an den "cénapses lipido-protéidiques" gegen negative Sulfonatgruppen des Waschmittels ausgetauscht würden. Es wäre allerdings zu fragen, in welchem Ausmaß die Molekülbindung durch die Trocknung auf dem Papier und die Elution mit Chloroform gelöst wurde.

Nach Gefriertrocknung des Serums läßt sich, wie Forbes und Mitarbeiter (19) angaben, normalerweise durch Chloroform nur eine kleine, aber konstante Menge an Cholesterin extrahieren. Diese Fraktion nannten sie "readily extractable cholesterol" (REC); sie bestand aus freiem und verestertem Cholesterin. Die Autoren postulierten, daß es sich hier um nicht oder nur lose an Eiweiß gebundenes Cholesterin handeln müsse. Bei Nephrose-Patienten war das REC außerordentlich hoch, bis zu 90 % des Gesamtcholesterins, ähnlich bei experimentell erzeugter Hypercholesterinämie im Tierversuch. Dagegen fand sich keine signifikante Erhöhung des REC bei Diabetes mellitus mit pathologischem Gesamtcholesterinspiegel. Diese Befunde wurden von anderen Autoren überprüft und bestätigt (10, 41).

Lever und Mitarbeiter (36) untersuchten zahlreiche Fälle von idiopathischer Hyperlipämie und primärer hypercholesterinämischer Xanthomatose. Sie schüttelten das Serum zweimal mit Äthyläther aus und zentrifugierten danach bei niedriger Geschwindigkeit. Das vorher trübe Serum wurde durch diese Behandlung völlig klar, die Neutralfette gingen fast restlos in den Äther über, die weit erhöhten Serumcholesterinwerte normalisierten sich, die Phospholipide nahmen dagegen dagegen nur geringfügig ab. Das extrahierte Cholesterin stammte aus der α_1 - und β -Lipoproteidfraktion, das Phospholipoid aus der β -Fraktion. Gleichzeitig nahm aber der Gesamteiweißgehalt des Serums ab; es ist unklar, ob somit tatsächlich Lipide abgetrennt wurden, oder ob Lipoproteidmoleküle in toto aus dem Serum entfernt wurden.

Lemaire und Mitarbeiter (33, 34, 35) trugen Serum auf Filterpapierstreifen auf, trockneten das Papier und wuschen es mit Äther, Aceton, Chloroform oder Trichloräthylen aus. Sie verglichen die Extraktionsraten bei normalen Seren und Seren von Arteriosklerotikern und fanden im letzteren Falle eine deutliche Vermeh-

rung. Sie schlossen daraus auf eine verminderte Bindungsstabilität der "cénapses lipido-protéïdiques" bei Arteriosklerose.

Eine ausgedehnte Untersuchung über die Extraktibilität der Serumlipoide mit Äther-Äthanolgemischen unterschiedlicher Konzentration führten Amatuzio und Mitarbeiter (1) durch. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Extraktionsrate bei Coronarerkrankungen statistisch signifikant größer sei als bei Normalpersonen gleichen Alters. Es fragt sich aber, ob mit dieser Technik nicht lediglich eine Fraktionierung durch graduell unterschiedliche Denaturierung vorgenommen wird.

Aus dem Institut für Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten bei der Universität München liegt eine Arbeit vor, in der die Extraktibilität der Serumlipoide beim Ausschütteln des Serums mit einer gleichen Menge Diäthyläther untersucht wird. Es entsteht bei der dort geschilderten Versuchsanordnung eine sogenannte "Gelschicht", die einen großen Teil der Serumlipoide enthält. Beim Vergleich zweier Gruppen, einmal klinisch gesunder Probanden, zum anderen von Patienten mit arteriosklerotisch bedingten Coronarerkrankungen werden Unterschiede in der Konzentration der in der "Gelschicht" enthaltenen Serumlipoide demonstriert (51). Auf einzelne der dort vorgetragenen Befunde wird in der folgenden Arbeit Bezug genommen werden.

4) Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit

Ob die oben kurz referierten Untersuchungen tatsächlich Rückschlüsse auf die Stabilität der Protein-Lipoid-Bindung und damit auf das Verhalten der Lipoproteide in Vivo erlauben, hängt wesentlich davon ab, daß die Bedingung gewahrt ist, die Proteinkomponente der Lipoproteide in ihrer Struktur und Löslichkeit nicht anzutasten. Für eine Beurteilung wäre es wesentlich, jene Vorgänge genau kennenzulernen, die sich bei der Durchmischung des Serums mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel abspielen. Die Untersuchungsmethoden der einzelnen Autoren sind sehr unterschiedlich, im Prinzip beruhen sie alle auf der schonenden Abtrennung der Lipoidanteile durch physiko-chemische Verfahren, von denen vorausgesetzt wird, daß sie die Proteine nicht angreifen.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich zunächst auf den Modellfall der Lipoidextraktion durch Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther. Das Verfahren ist einfach und relativ gut überschaubar. Die hier angewendete Technik ist im wesentlichen die gleiche, die Schäfer für seine Versuche ausarbeitete (51).

Es soll noch einmal untersucht werden, wie sich das Serum beim Ausschütteln mit Äther verändert. Welche physiko-chemischen Vorgänge lassen sich dabei erfassen? Wie verhalten sich speziell die Lipoproteide, ändert sich ihr Löslichkeitsverhalten, ihre Protein-Struktur? Ist der Vorgang der Lipoidabtrennung reversibel? Von einer Lipoidextraktion läßt sich erst sprechen, wenn die Lipoide von ihren Trägerproteinen abgetrennt werden. Im reinen Äther sind Proteine nicht

löslich; nur die darin gelösten Lipide können mit Sicherheit als abgetrennt gelten. Läßt sich das gesamte Serumlipoid durch Äther abtrennen oder bleiben Restbestände zurück, die nicht angegriffen werden ? Ist der Extraktionsverlauf lediglich abhängig von der Konzentration der Lipide im Serum ?

Nach der Durchmischung des Serums mit Äther setzen sich drei Mischphasen ab. Ihre Zusammensetzung soll untersucht werden. Ist die Verteilung der Lipide bzw. Lipoproteide in diesen Phasen nur von der Ausgangskonzentration abhängig oder zeigen sich davon unabhängige, für bestimmte Seren charakteristische Unterschiede ? Wie ist die Verteilung nach einmaligem Ausschütteln des Serums, wie nach wiederholtem Ausschütteln der untersten, serumähnlichen Phase ? Aus dieser Phase werden die Lipide zunehmend entfernt. In welchem Verhältnis stehen die dort zurückbleibenden Lipoidkonzentrationen zum Ausgangswert; sind bei gleichem Ausgangswert Unterschiede feststellbar, wenn normale Seren mit solchen arteriosklerotischen erkrankter Personen verglichen werden ?

Ist endlich die Forderung erfüllt, daß die Proteinkomponente der Lipoproteide unbeschädigt bleiben soll ? Läßt sich mit der beschriebenen Methode eine Aussage über die Stabilität der Lipoid-Protein-Bindung machen, die über die bekannte Tatsache hinausgeht, daß bei hohen Lipoidkonzentrationen im Serum größere, weniger widerstandsfähige Partikel vorliegen ?

Mit dem obigen Verfahren werden die Lipoproteide zunächst als einheitliche Stoffklasse erfaßt. Sie lassen sich aber, unter anderem elektrophoretisch, in mehrere Fraktionen unterteilen. Es soll versucht werden, die Lipide aus aufgetrennten Fraktionen mit einem einfachen Verfahren zu extrahieren. Es interessiert dabei hauptsächlich, ob α - und β -Fraktion ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Für diese Fragestellung ist eine grobe färbereische Bestimmung der Lipide ausreichend.

II. EXTRAKTION DER LIPOIDE DURCH AUSSCHÜTTELN DES SERUMS MIT DIÄTHYLÄTHER

1) Beschreibung der Veränderung des Serums beim Ausschütteln mit Diäthyläther

Wird Serum mit wasser- und peroxydfreiem Diäthyläther manuell oder maschinell ausgeschüttelt und anschließend einige Minuten stehengelassen, so bilden sich in dem Gefäß drei Schichten, eine untere klare Serumphase, eine obere klare Ätherphase und zwischen diesen eine trübe Mischphase.

Die Mischphase tritt bereits bei leichten Schüttelbewegungen auf. Sie ist zunächst dünn und durchscheinend und wird, abhängig von der Dauer des Ausschüttelns und von der Menge des zugefügten Äthers, dicker und dichter. Durch Zentrifugieren bei 3500 U/min erhält sie eine festere gelatineartige Konsistenz und läßt sich leicht von den beiden anderen Phasen abtrennen.

Nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur löst sich die Mischphase wieder weitgehend in der darunter befindlichen Serumphase, wobei es keine Rolle spielt, ob der Äther darüber abgedampft oder belassen wird. Das Serum erscheint danach aber stärker getrübt und von einzelnen Schlieren durchzogen. An seiner Oberfläche bleibt eine dünne weißliche Schicht, die sich nicht mehr mit dem Serum vermischt. Man kann sie abtrennen, und es zeigt sich, daß sie in hydrophilen wie in lipophilen Lösungsmitteln nicht löslich ist. Versuche, sie elektrophoretisch aufzutrennen (Technik s. u.), mißlingen. Am Startpunkt bleibt das gesamte Material liegen. Es läßt sich auf dem Papier sowohl mit Bromphenolblau wie mit Sudanschwarz anfärben. Daraus darf geschlossen werden, daß es sich hier um denaturierte Lipoproteide handelt. Der Lipoidanteil kann mit Äthanol restlos ausgewaschen werden, so daß dann eine Fettfärbung nicht mehr möglich ist.

Wird die Serumphase isoliert elektrophoretisch untersucht, so sind im Eiweiß-elektropherogramm alle Albumin- und Globulinfraktionen nachzuweisen. Eine signifikante Abnahme gegenüber dem Ausgangsserum kann normalerweise nur im Bereich der α_1 -Globuline festgestellt werden, während alle anderen Fraktionen nicht wesentlich verändert scheinen. Die Fettfärbung des Papierstreifens mit Sudanschwarz dagegen ergibt im Bereich der β -Lipoproteide einen weitgehenden Verlust des anfärbbaren Materials, einen demgegenüber nur geringen Verlust der α -Fraktion (Abb. 2 b).

Die durch Zentrifugieren abgetrennte Mischphase enthält einen hohen Anteil an Äther. Wird er vorsichtig abgedampft, so geht die gelatineartige Konsistenz des Materials verloren. Es bildet sich eine trübe Suspension und darüber wieder eine dünne weiße Schicht von gleicher Beschaffenheit wie die oben beschriebene. Wird die gesamte

ätherfreie Mischphase mit der gleichen Menge Aqua dest. verdünnt und elektro-phoretisch untersucht, so sind im Eiweißelektropherogramm wieder alle Fraktionen einschließlich der α_1 -Globuline nachweisbar. Lediglich am Startpunkt ist eine große Menge an Protein liegengeblieben. Läßt man diese unberücksichtigt, so scheint die Verteilung der Fraktionen nahezu dieselbe wie im Ausgangsserum zu sein. Bei der Fettfärbung sieht man dann, daß etwa 80 bis 90 % des lipid-haltigen Materials am Startpunkt zurückgeblieben, und daß α - und β -Fraktion nur noch undeutlich auszumachen (Abb. 2 c). Trennt man von der ätherfreien Mischphase die überstehende weiße Schicht durch Zentrifugieren ab, so ist in ihrem Eiweißelektropherogramm nur wenig Startpunkt-Protein mehr zu sehen. Das Startpunkt-Lipoid ist etwa um zwei Drittel vermindert (Abb. 2 d).

Schüttelt man die Mischphase, nachdem der Äther zunächst abgedampft worden ist, wieder mit einem gleichgroßen Ätherquantum aus, so beobachtet man eine dünne untere serumähnliche Schicht, eine Schicht von gelatineartiger Konsistenz und darüber eine niedrige Schicht klaren Äthers. Der Äther enthält nur wenig Lipoid. Wird die zum Ausschütteln verwendete Äthermenge vergrößert, so wird dennoch, selbst bei einem Verhältnis Serum : Äther = 1 : 20 nur ein Bruchteil des Lipoidgehaltes aus der Mischphase ausgewaschen.

Aus den obigen Befunden ist zu schließen, daß die Mischphase neben den Anteilen an Diäthyläther und Wasser alle Proteinfractionen des Serums in fast unveränderter Zusammensetzung enthält, vermehrt sind lediglich die Lipoproteide, vor allem der β -Fraktion, die zum überwiegenden Teil ihre Löslichkeit und ihre Wanderungs-fähigkeit in der Elektrophorese verloren haben.

2) Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther im Verhältnis 1 : 1

Die quantitative Untersuchung der Lipoide in allen drei Phasen sollte über deren Verteilung Auskunft geben. Es interessierte dabei nicht nur der Zustand, der nach einmaligem Ausschütteln erreicht wird, sondern vor allem die Verteilung der Lipoide nach mehrmaliger Wiederholung des ganzen Vorgangs. Es wurde deshalb festgelegt, daß die Seren achtmal in der gleichen Weise ausgeschüttelt werden sollten, das heißt, die Serumphase sollte abgetrennt und weiterbehandelt werden.

a) Methodik

Das morgens von nüchternen Probanden entnommene Venenblut wurde zur Gerinnung eine Stunde stehengelassen, dann zweimal zwanzig Minuten lang bei 3500 U/min zentrifugiert. Das abgetrennte Serum wurde innerhalb der nächsten sechs Stunden weiterverarbeitet.

Es wurden 5 ml Serum mit 5 ml Äther in verschlossenen 50 ml-Kolben zehn Minuten lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ maschinell ausgeschüttelt (90 mal pro Minute). Der gesamte Inhalt

des Kolbens wurde dann sofort in ein Zentrifugenglas umgegossen und unter Verschuß zehn Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert.

Es war nicht schwierig, die Serumphase mit einer Kanüle durch die Mischphase hindurch abzusaugen und ebenso wie den überstehenden Äther für die weitere Untersuchung abzutrennen.

Proben der Serumphase aus mehreren Gläsern wurden zusammengegossen, 5 ml davon wieder mit einer gleichen Menge Äther versetzt und erneut ausgeschüttelt. Dieser Vorgang wurde insgesamt achtmal wiederholt.

Die Schichtdicke der Phasen in den Zentrifugengläsern wurde gemessen.

Aus der Serum- und der Ätherphase wurden Lipide und Gesamteiweiß quantitativ bestimmt; Freies und Gesamtcholesterin nach Schönheimer und Sperry (55), veresterte Fettsäuren nach Appel und Hansen (3), Phospholipide nach Fiske und Subbarow in der Modifikation von Krainick (30), Gesamteiweiß in der Serumphase nach der Biuret-Methode (39), Stickstoff im Äther nach Strauch (57), Cholesterin der β -Lipoproteide nach Fried und Hoeflmayr (20).

Ausgangsserum und Serumphasen wurden elektrophoretisch untersucht. Die Elektrophorese wurde in einer Durrum-Zelle der Fa. Beckman nach deren Anleitung mit Veronal-Natrium-Puffer ausgeführt. Es wird empfohlen, für die Eiweißauftrennung 0,006 ml Serum, für die Lipidauftrennung 0,02 ml Serum in einem 3 cm langen Querstrich aufzutragen. Das benutzte Papier war die Spezifität Nr. 2043 aMgl der Fa. Schleicher und Schüll. Die Dauer der Auftrennung betrug zwanzig Stunden bei einer Klemmenspannung von 70 - 80 V und einer Stromstärke von 2,5 mA pro Zelle. Bei dieser Technik wandern die γ -Globuline kathodisch, alle anderen Fraktionen anodisch. Trocknung der Streifen 30 Minuten bei 120 °C. Anfärbung der Proteine auf dem Papier mit Bromphenolblau in reinem Methanol, der Lipoproteide mit einer gesättigten Lösung von Sudanschwarz in sechzigprozentigem Alkohol. Auswertung im "Analytrol" der Fa. Beckman. Der Kurvenverlauf des Elektropherogramms wurde mit den gefärbten Streifen verglichen und jede Fraktion nach Maßgabe der Gaußschen Kurve von den anderen abgetrennt. Alle Bestimmungen wurden gedoppelt ausgeführt, die angegebenen Werte sind Mittelwerte.

Es wurden mit dieser Methode Seren von insgesamt 24 Patienten untersucht. Es handelte sich um Männer zwischen 30 und 45 Jahren. 13 davon waren klinisch gesund, bei den übrigen war klinisch und nach dem EKG-Befund die Diagnose Coronarsklerose gestellt worden. Die Seren der 11 an Coronarsklerose erkrankten Patienten wurden in Gruppe A zusammengefaßt, die Vergleichsgruppe B umfaßt die Seren der gesunden Probanden.

b) Ergebnisse

Die Ätherphase enthielt stets nur sehr geringe Mengen an Lipoiden. Darunter waren Phospholipide überhaupt nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Die Konzentration an Cholesterin (Gesamtcholesterin) und veresterten Fettsäuren überstieg 5 - 10 mg % in keinem Falle. Besonderes Gewicht wurde der Frage beigemessen, ob neben freien Lipoiden auch proteinhaltige Bruchstücke oder ganze Lipoproteidmoleküle in den Äther übergegangen waren. Mit der sehr leistungsfähigen Methode von Strauch wurde der Rückstand aus der Ätherphase auf seinen Stickstoffgehalt untersucht. Es können mit dieser Methode bereits 0,5 % Stickstoff nachgewiesen werden. Der Rückstand erwies sich als stickstoff- und somit auch eiweißfrei.

Es wäre von Interesse gewesen, die in der Mischphase gelösten freien Lipide zu bestimmen. Sie konnten jedoch nicht exakt abgetrennt werden, da eine Ultrazentrifuge nicht zur Verfügung stand. Wurde die Mischphase mit Äther weiter ausgeschüttelt, so wurde schließlich das gesamte Lipoidmaterial schrittweise extrahiert. Es wurden also auch die vorher wahrscheinlich noch an Eiweiß gebundenen Lipide mitentfernt.

Die Schichtdicke der Mischphase nach dem ersten Ausschütteln war bei den untersuchten Seren sehr unterschiedlich (1 - 4 ml); eine direkte Abhängigkeit von der Konzentration der Lipide im Ausgangsserum wie in dieser ersten Mischphase selbst konnte nicht festgestellt werden. Beim zweiten Ausschütteln war dann die Schichtdicke wesentlich geringer, und sie nahm mit jeder Wiederholung des Vorgangs ab. Zuletzt war nurmehr ein schmaler trüber Schleier zwischen Serum und Äther zu bemerken.

Die Eiweißelektropherogramme der Ausgangsseren zeigten nur in vier Fällen - es handelte sich dabei um Patienten mit coronarsklerotischen Veränderungen - ein deutlich von der Norm abweichendes Verhalten und zwar im Sinn einer β -Globulin-Vermehrung um 3,1 bis 4,1 % gegenüber dem Mittelwert der anderen Fälle. Bei diesen Patienten (B, L, K, A) fand sich auch eine starke Hyperlipämie und analog im Lipoproteidelektropherogramm eine Erhöhung der β -Lipoproteide, deren Anteil 85 bis 90 % der Gesamtlipoproteide ausmachte. Die Mittelwerte für die Fraktionen im Eiweißelektropherogramm aller übrigen Fälle betragen:

Alb. :	62,3 (61,1 - 63,9) %
α_1 :	4,1 (3,8 - 4,3) %
α_2 :	7,6 (6,8 - 8,0) %
β :	10,3 (9,4 - 10,9) %
γ :	15,4 (14,3 - 16,1) %.

Im Lipoproteidelektropherogramm wurden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen und Abweichungen vom Mittelwert deutlicher. Die Unterteilung wurde in Übereinstimmung mit der Literatur nach folgenden Gesichtspunkten vorgenommen: die am schnellsten wandernde Fraktion ist als α -Fraktion bezeichnet, die langsamer wandernde als β -Fraktion. Zwischen dieser und dem Startpunkt färbt sich noch weiteres lipoidhaltiges Material an, das als Fettrest (F) bezeichnet ist. Die Mittelwerte waren:

Gruppe A: α : 12,2 (5 - 25) %
 β : 72,1 (64 - 83) %
 F : 15,7 (8 - 24) %

Gruppe B: α : 17,4 (11 - 25) %
 β : 68,0 (51 - 73) %
 F : 14,7 (10 - 19) %.

Bei der Lipoproteidelektrophorese der Serumphase fiel, wie oben schon beschrieben, nach dem ersten Ausschütteln zunächst die starke Abnahme der β -Fraktion gegenüber einer geringeren der α -Fraktion auf. Diese Beobachtung galt für alle untersuchten Seren. Mit jeder Wiederholung des Ausschüttelns verringerte sich dann der Anteil der β -Fraktion weiterhin, aber auch die α -Fraktion ließ sich immer weniger deutlich darstellen. Spätestens nach der vierten Wiederholung war in allen Fällen kaum noch eine Abgrenzung der Fraktionen möglich. Der sogenannte Fettrest verhielt sich dabei gleichartig wie die β -Fraktion.

Das Eiweißelektropherogramm dagegen blieb während der ganzen Prozedur weitgehend gleich. Auch in der achten Serumphase wurde, außer bei den erwähnten vier Patienten, lediglich im Bereich der α_1 -Globuline ein signifikanter Verlust gegenüber dem Ausgangsserum deutlich. Die α_1 -Globuline stellen nun aber den schmalsten Anteil im Spektrum der elektrophoretisch dargestellten Eiweißfraktionen, so daß hier geringe Verluste bereits leicht erkennbar werden, während die β -Globuline, die den größten Teil der Lipide transportieren, eine stärkere Fraktion sind. Der Eiweißanteil der β -Lipoproteide ist zudem sehr gering. Im Elektropherogramm werden die Proteinfractionen nicht quantitativ erfaßt, sondern es wird nur ihr mengenmäßiges Verhältnis zueinander bestimmt und in Prozent der Gesamtmenge angegeben. Wird eine Fraktion dabei kleiner, so verschieben sich die Proportionen zugunsten der anderen. Berücksichtigte man dies, so ließ sich auch eine Abnahme der β -Globuline errechnen. Eine stärkere Abnahme zeigte sich bei den vier hyperlipämischen Seren; hier war ein vorher spitzer β -Gipfel deutlich abgerundet worden.

Von einem Eiweißverlust des Ausgangsserums kann man nur insofern sprechen, als in der Mischphase die Lipoproteide besonders angereichert sind. Die Bestimmung des Gesamteiweißes in der Serumphase ergab allgemein ein Absinken der Konzentration gegenüber dem Ausgangsserum um maximal 0,2 g% nach dem ersten und

maximal 0,4 g% nach dem achten Ausschütteln. Die verschiedenen untersuchten Seren zeigten hinsichtlich ihres Verhaltens hier keine verwertbaren Unterschiede.

In Abb. 3 sind die Ergebnisse der Lipoidbestimmung im Ausgangsserum und den einzelnen Serumphasen in Diagrammen zusammengefaßt. Alle Werte sind in mg% angegeben. Jede Säule stellt als Gesamtes die Ausgangskonzentration, die Abschnitte darin stellen die jeweilige Konzentration in den Serumphasen dar. Der Übersichtlichkeit halber sind nur die beim ersten, vierten und achten Ausschütteln ermittelten Werte aufgeführt. Die Ausgangswerte liegen bei Gruppe A im Durchschnitt wesentlich höher als bei Gruppe B. Sie sind jeweils nach ihrer Höhe eingeordnet. Es ist außerdem in Abb. 3 b das Verhältnis von Phospholipoid zu verestertem Cholesterin im Ausgangsserum und in den Serumphasen eingetragen.

3) Ergänzender Fettbelastungswert

Um die Abhängigkeit der Lipoidkonzentration in der Serumphase vom Ausgangswert noch einmal bei gesunden Versuchspersonen genauer überprüfen zu können, wurde ein Test durchgeführt, in dessen Verlauf bei den Probanden eine alimentäre Hyperlipämie experimentell erzeugt wurde.

a) Methodik

Vier gesunde männliche Probanden wurden an zwei, eine Woche auseinanderliegenden Tagen untersucht.

Es wurde morgens zunächst Nüchtern-Blut entnommen. Dann erhielt jeder Proband 1 g Butter /kg Körpergewicht als Brotaufstrich auf Knäckebrot. In Abständen von 2 Stunden wurde dann wieder Blut abgenommen, insgesamt viermal.

Die Aufbereitung des Serums erfolgte wie oben beschrieben. Das Serum wurde mit Diäthyläther einmal 10 Minuten lang wie oben ausgeschüttelt, dann zentrifugiert. Die Serumphase wurde abgetrennt.

Die quantitative Analyse der Lipide im Ausgangsserum und in dieser Serumphase wurde ebenfalls mit den oben angegebenen Methoden durchgeführt.

b) Ergebnisse

Die Lipoidkonzentrationen sind wieder in Diagrammen dargestellt, wobei jede Säule als Ganzes die Ausgangskonzentration, die Unterteilung die Konzentration in der Serumphase wiedergibt. Alle Werte sind in mg% angegeben (Abb. 4). Unterschiede in der Schnelligkeit der Fettklärung sind deutlich zu erkennen.

4) Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther im Verhältnis 1 : 20

In der Literatur (63) wird beschrieben, daß es gelingt, die Lipide mit Diäthyläther vollständig aus dem Serum zu extrahieren. Bei der unter 2 a) angegebenen Untersuchungstechnik gingen nur sehr wenig Lipide in das Lösungsmittel über. Die Anreicherung lipoidhaltigen Materials in der Mischphase kann ja nicht als ein echter Extraktionsvorgang angesehen werden. Da das Verhältnis Serum : Äther für die Extraktionsrate eine große Rolle spielen dürfte, wurde es in dem Sinne abgeändert, daß ein großer Ätherüberschuß bestand.

a) Methodik

In verschlossenen 50-ml-Kolben wurde 1 ml Serum mit 20 ml wasser- und peroxidfremem Diäthyläther zehn Minuten lang + 4 °C maschinell 90 mal/min ausgeschüttelt, dann zehn Minuten stehengelassen.

Der überstehende Äther wurde vorsichtig bis auf einen geringen Rest abgesaugt, der im Kolben verbleibende Rückstand mit 20 ml frischem Äther überschichtet und erneut ausgeschüttelt. Mehrere Kolben mit demselben Serum wurden gleichzeitig ausgeschüttelt. Nach jedem Extraktionsschritt wurde ein Kolben entnommen und für die quantitative Lipoidanalyse aufgehoben. Der Vorgang wurde insgesamt 30 mal wiederholt.

Nach Absaugen des Äthers wurden die restlichen Lipide aus dem Rückstand im Kolben mit Alkohol-Äther (3 : 1) nach Bloor extrahiert. Es wurden nicht alle dreißig Serumphasen untersucht, sondern zunächst jede zweite, später jede vierte. Die Lipide wurden mit den oben angegebenen Methoden quantitativ bestimmt. Der abgesaugte Äther wurde gesammelt, eingedampft und mit der Methode von Strauch auf Stickstoff untersucht.

In einer zweiten parallellaufenden Versuchsreihe wurden dieselben Seren mit wassergesättigtem Äther ausgeschüttelt. Die Versuchsanordnung war ansonsten gleichartig.

Es wurden sechs verschiedene Seren untersucht (B, H, G, S, D, T). Bei den Patienten E, H, S bestanden ausgeprägte coronarsklerotische Veränderungen, die übrigen waren klinisch gesund.

b) Ergebnisse

Auch bei dieser Versuchsanordnung entsteht eine Mischphase, deren Schichtdicke beim ersten Ausschütteln in etwa dem gleichen Verhältnis zur Serumphase steht wie bei den oben beschriebenen Methoden. Die Mischphase wurde jetzt nicht abgetrennt. Nach drei- bis viermaligem Ausschütteln mit wasserfreiem Äther zeigte der ganze im Kolben zurückbleibende Rückstand eine ölig-visköse

Konsistenz, nach acht- bis zehnmalem Ausschütteln wurde er körnig-trocken.

Die Austrocknung unterblieb, wenn statt des wasserfreien wassergesättigter Äther verwendet wurde. Es entstand aber auch hier eine Mischphase. Nach mehrmaligem Ausschütteln beobachtete man auch, daß der ganze, im Kolben verbleibende Rückstand ölig-viskös wurde.

In dem abgetrennten Äther konnte in beiden Versuchsreihen kein Eiweiß nachgewiesen werden.

Der körnig-trockene Rückstand löste sich auch nach dem dreißigsten Extraktionsschritt fast völlig wieder in 1 ml Aqua dest. auf. Die Lösung erschien leicht getrübt und farbstofffrei. Elektrophoretisch ließen sich nach Anfärben mit Bromphenolblau auf dem Papier alle Proteinfractionen nachweisen. Nur die α_1 - und β -Globuline waren etwas vermindert, dafür war der Startpunkt stärker betont. Mit Sudanschwarz gelang keine Darstellung von Lipoiden mehr. Dagegen war in der Elektrophorese des sechsten oder achten Rückstandes zwar ein starker Verlust der α - und β -Lipoproteidfraction zu sehen, aber auch eine große Menge am Startpunkt lieengebliebenen lipoidhaltigen Materials.

Bei Extraktion mit wassergesättigtem Äther stellte sich nach vorsichtigem Abdampfen des Äthers auch der dreißigste Rückstand als eine nur leicht getrühte Lösung dar. Das Eiweißelektropherogramm zeigte kaum Veränderungen gegenüber dem des Ausgangsserums. Eine sichere Abnahme der α_1 - und β -Globuline ergab sich nicht, obwohl der Startpunkt deutlicher betont war. Die Färbung mit Sudan-schwarz ergab sehr geringe Reste beweglicher Lipoproteide der α - und β -Fraktion bei Überwiegen der am Startpunkt lieengebliebenen lipoidhaltigen Substanzen.

Damit stimmte überein, daß selbst durch dreißigfaches Ausschütteln mit wassergesättigtem Äther die Lipide nicht ganz aus dem Serum entfernt werden konnten. Die Extraktionskurve zeigte jedoch abfallende Tendenz.

Beim Ausschütteln mit wasserfreiem Äther dagegen waren im dreißigsten Rückstand überhaupt kein Cholesterin und nur in zwei Fällen noch Reste von Phospholipoiden und veresterten Fettsäuren nachweisbar.

Die Lipoidkonzentrationen im Ausgangsserum und den Rückständen wurden in Diagrammen dargestellt. Es sind für jedes der untersuchten Seren Extraktionskurven gezeichnet. Es sind die Werte eingetragen, die sich beim Ausschütteln mit wasserfreiem wie mit wassergesättigtem Äther ergaben,

5) Diskussion

Die entscheidende Rolle bei der Extraktion der Serumlipide durch Ausschütteln mit Diäthyläther scheint der beschriebenen Mischphase zuzukommen. Sie entsteht nur dann, wenn das Serum Lipide bzw. Lipoproteide enthält, und ihre Schichtdicke ist

von deren Konzentration abhängig. Eine genau definierte Abhängigkeit dieser beiden Größen voneinander ließ sich allerdings nicht feststellen.

Wie kann man sich nun erklären, daß eine derart stabile Mischphase zustandekommt? Die Bestandteile sind bekannt; es sind enthalten alle Anteile des Serums mit einer besonderen Anreicherung der Serumlipoide, Wasser und etwa zur Hälfte der Masse das hydrophobe organische Lösungsmittel. Man erwartete eigentlich, daß sich nach dem Ausschütteln die wässrige von der hydrophoben Phase, da sie in-
einander nur gering löslich sind, sofort wieder klar absetzte, wie man dies ja beobachtet, wenn reines Wasser mit Äther ausgeschüttelt wird. Es müssen also die in Lösung befindlichen Substanzen für die Entstehung der Mischphase verantwortlich sein.

Wird die gesättigte Lösung eines Salzes (z. B. CuSO_4) mit Äther intensiv durchmischt, so fällt eine größere Menge des Salzes an. Dies ist z. T. wohl zurückzuführen auf den Entzug von Lösungswasser, das in den Äther bis zur Sättigung übergeht, zum anderen Teil auf Störungen des elektrostatischen Gleichgewichtes der wässrigen Lösung durch das organische unpolare Lösungsmittel. Beim Ausschütteln des Serums mit Äther ist der Wasserentzug offensichtlich ebenfalls von Bedeutung; es wurde ja gezeigt, daß das Serum durch große Äthermengen praktisch "getrocknet" werden kann, so daß nur noch die festen Bestandteile zurückbleiben. Da die Lipoproteide besonders empfindlich auf Wasserentzug reagieren, könnte man annehmen, daß sie als erste Eiweißfraktion ausfallen. Dagegen steht die Beobachtung, daß auch bei Verwendung wassergesättigten Äthers eine gleichartige Mischphase zustandekommt. Sie verdankt ihre Entstehung also wohl der Durchmischung des wässrigen Milieus mit dem organischen unpolaren Lösungsmittel.

In der Mischphase fällt die Anreicherung lipidhaltigen Materials auf. Es kann sich nicht um freie, abgetrennte Lipide handeln, da diese im lipophilen Lösungsmittel gelöst würden. Das lipidhaltige Material kann durch Zentrifugieren von den übrigen Anteilen der Mischphase getrennt werden; es ist die beschriebene "weiße Schicht". Diese enthält auch Eiweiß, und die Annahme ist wohl berechtigt, daß sie aus denaturierten Lipoproteidmolekülen zusammengesetzt ist. Solche Moleküle sind als Ganzes im Äther nicht löslich. Sie müssen andererseits zusammen mit dem Äther für die Konsistenz der Mischphase entscheidend sein. Wird nämlich der Äther abgedampft, dann setzt sich die "weiße Schicht" von den anderen Bestandteilen der Mischphase ab. Diese anderen Bestandteile sind intakte Proteinfraction in normaler Verteilung, gelöst im Serum-Wasser, zusammen mit den sonstigen im Serum enthaltenen Stoffen. Als Vorbild für die Entstehung der Mischphase könnten Vorgänge dienen, die wir von der Gelifizierung kolloidaler Lösungen her kennen: ausgefallte Lipoproteidteilchen verbinden sich unter Beteiligung des Lösungsmittels Äther zu größeren Komplexen, wodurch ein großporiges schwammartiges Gefüge entsteht, das, von geringerer Dichte als das Serum, auf diesem schwimmt und außerdem Serumanteile in seine Poren aufsaugt.

Um die Verteilung der Lipoproteide in den einzelnen Phasen beurteilen zu können, werden hier zunächst die Befunde besprochen, die sich beim Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther im Verhältnis 1 : 1 ergeben.

Die Abnahme der Gesamteiweißkonzentration im Serum bzw. den Serumphasen ist gering, maximal 0,2 g% nach dem ersten und 0,4 g% nach dem achten Ausschütteln, also ungefähr 1/4 bzw. 1/2 des Lipoproteideiweißes. Dies wäre in Übereinstimmung zu bringen mit der Abnahme der eiweißarmen β -Lipoproteidfraktionen im Serum nach einmaligem Ausschütteln, widerspricht aber dem Elektrophoresebefund, daß nach wiederholtem Ausschütteln auch die eiweißreiche α -Lipoidfraktion nicht mehr nachweisbar ist. Zwei Fehlermöglichkeiten müssen in Betracht gezogen werden; einmal wird dem Serum durch das Ausschütteln mit Äther Wasser entzogen, es wird praktisch eingedickt, so daß die Abnahme der Gesamteiweißkonzentration nicht richtig zum Ausdruck kommt, zum anderen muß die Anfärbbarkeit der verschiedenen Lipoide - denn nach diesen wird ja die Verteilung der Lipoproteide im Elektropherogramm bestimmt - berücksichtigt werden; Phospholipoide färben sich wesentlich schlechter an als Cholesterinester. Wenn sich also im Elektropherogramm der Serumphase kaum noch Lipoproteide nachweisen lassen, können dennoch größere Mengen besonders phosphatidreicher Moleküle zurückgeblieben sein. Die quantitative Analyse der Lipoide bestätigt diese Überlegung; auch nach achtmaligem Ausschütteln lassen sich in der Serumphase noch recht beträchtliche Lipoidmengen bestimmen.

Unklar bleibt, in welcher Lipoproteidfraktion diese Restmenge mitgeführt wird. Das nach Fried und Hoefflmayr (20) gesondert bestimmte Cholesterin der β -Lipoproteide hatte eine eindeutige Auskunft über die Beteiligung der Lipoproteidfraktionen an der Mischphase geben sollen. Die Methode wies aber eine so große Fehlerbreite auf, daß die Ergebnisse nicht zu verwerten sind; wie aus Abb. 3 a und b zu ersehen ist, ergaben sich in der Serumphase zuweilen höhere Konzentrationen an α -Lipoproteidcholesterin als im Ausgangsserum !

Einen gewissen Anhalt zu dieser Frage gibt die Veränderung des Quotienten aus Phospholipoid- und Estercholesterinkonzentration (s. Abb. 3 b). Die α -Fraktion der Lipoproteide ist besonders reich an Phospholipoiden, die β -Fraktion an verestertem Cholesterin. In der Regel haben Seren mit erhöhtem Cholesteringehalt einen niedrigeren Quotienten als normale Seren. Nach dem ersten Ausschütteln bereits ergibt sich für die Serumphase in der Mehrzahl der Fälle ein geringer, nach dem achten Ausschütteln in allen Fällen ein erheblicher Anstieg des Quotienten. Es darf daraus geschlossen werden, daß bevorzugt cholesterinreiche Moleküle in die Mischphase überführt werden. Das muß jedoch nicht bedeuten, daß die relativ phosphatidreicheren Moleküle, die in der Serumphase zurückgeblieben sind, alle der α -Fraktion angehören. Vielmehr ist zu beachten, daß die im Elektropherogramm homogen erscheinende β -Fraktion in Wirklichkeit aus sehr unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt ist (vgl. Abb. 1).

Aus dem Lipoproteid-Elektropherogramm kann lediglich klar entnommen werden, daß beim ersten Ausschütteln der größte Teil der β -Lipoproteide in die Mischphase übergeht, aus der α -Fraktion dagegen nur ein geringer Prozentsatz. Nach mehrfacher Wiederholung des Ausschüttelns sind am Ort der α - und β -Fraktion auf dem Papier keine Lipide mehr mit Sudanschwarz anfärbbar, durch die quantitative Analyse lassen sich dagegen noch größere Lipoidmengen nachweisen.

Die quantitative Analyse zeigt, analog dem elektrophoretischen Befund, daß der größte Teil der Lipide bereits beim ersten Ausschütteln in die Mischphase überführt wird. Danach werden nurmehr geringe Lipoidmengen aus dem Serum entfernt. Die Schichtdicke der Mischphase wird entsprechend geringer. Je höher die Lipoidkonzentration im Ausgangsserum war, desto höher ist sie auch in der Mischphase. Die in der Serumphase zurückbleibenden Restkonzentrationen sind auffallend konstant (Abb. 3, 4). Sie zeigen, was freies Cholesterin, Phospholipide und veresterte Fettsäuren angeht, keine Abhängigkeit vom Ausgangswert. Eine solche Abhängigkeit läßt sich hingegen für das veresterte Cholesterin feststellen; je höher die Ausgangskonzentration, desto niedriger die Restkonzentration in der ersten Serumphase (Abb. 6). Diese Regel gilt nur für die erste Serumphase; nach mehrmaligem Ausschütteln sind keine signifikanten Abweichungen vom Mittelwert mehr feststellbar.

Alle Unterschiede, die sich zunächst bei Betrachtung der Mittelwerte der Gruppen A und B sowie der beim Fettbelastungstest untersuchten Seren ergeben, können auf Unterschiede im Ausgangswert zurückgeführt werden. Auch die alimentäre Hyperlipämie hat auf die Bildung der Mischphase und die Verteilung der Lipide keine anderen Auswirkungen als die essentielle Hyperlipämie.

Es läßt sich festhalten, daß bevorzugt die besonders cholesterinreichen Moleküle am Aufbau der Mischphase beteiligt sind, während cholesterinärmere im Serum stabiler zu sein scheinen. Die Durchmischung des Serums mit Äther führt zu einer selektiven Ausfällung bestimmter Lipoproteide, vergleichbar der Ausfällung durch andere organische Lösungsmittel, z. B. Äthanol, nur daß bei Verwendung von Äther die ausgefällten Moleküle nicht zu Boden sinken, sondern eine auf dem Serum schwimmende Gelschicht bilden. Für den Grad der Ausfällung ist die Konzentration des Lösungsmittels entscheidend, wie sich bei einem geänderten Serum-Äther-Verhältnis zeigt.

Daß mit der Erhöhung der Cholesterinkonzentration im Ausgangsserum die Restkonzentration in der ersten Serumphase geringer wird, läßt sich auch mit einem elektrophoretischen Befund in Zusammenhang bringen, der bei der zahlenmäßigen Angabe der prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen nicht zum Ausdruck kommt; bei hohem Cholesteringehalt und hohem β -Lipoproteidgehalt finden wir nicht nur eine relative, sondern auch eine absolute Verminderung der α -Fraktion, eine Verschiebung der Lipide in den Bereich der langsamer wandernden Lipoproteide.

Nur die in der Ätherphase gelösten Lipide können mit Sicherheit als freie, also aus den Lipid-Protein-Komplexen abgetrennte Lipide angesehen werden, denn die Ätherphase erweist sich ja als eiweißfrei. Die Konzentration dieser freien Lipide in der Ätherphase hängt vom Äther-Serum-Verhältnis ab. Sie nimmt wesentlich zu, wenn dieses Verhältnis von 1 : 1 auf 20 : 1 vergrößert wird. Für den Zusammenhalt der Lipid-Protein-Komplexe, auch in der Mischphase, ist das Vorhandensein von Wasser maßgeblich. Beim Ausschütteln mit wassergesättigtem Äther entsteht zwar auch eine Mischphase, es werden jedoch wesentlich geringere Lipidmengen an die Ätherphase abgegeben als bei Verwendung wasserfreien Äthers (Abb. 5).

Auch mit wasserfreiem Äther in hohem Überschuß lassen sich die Lipide nur schrittweise mit jeder Wiederholung des Ausschüttelns extrahieren. Offenbar erfolgt eine Verteilung der Lipide zwischen zwei Medien unterschiedlicher Affinität. Die Konzentration der Lipoproteide in der Mischphase, die bei fettreichen Seren höher ist als bei fettarmen, scheint keinen Einfluß auf den Extraktionsmodus zu haben. Ob die Lipide der α -Fraktion in gleicher Weise an den Äther abgegeben werden wie die der β -Fraktion, läßt sich aus dem Kurvenverlauf nicht entnehmen. Auch die Frage, ob der Lipidanteil eines Moleküls jeweils als Komplex oder ob seine Bestandteile einzeln aufgelöst werden, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar sind in einigen Fällen Phospholipide und veresterte Fettsäuren im 26. oder 30. Rückstand aus Serum- und Mischphase noch nachweisbar, freies und verestertes Cholesterin dagegen nicht mehr, aber, da die Zusammensetzung der Lipoproteidmoleküle unterschiedlich und für den Einzelfall nicht bekannt ist, ist dieser Befund nicht zu verwerten.

Der Modus der Lipidverteilung zwischen Serum und Äther ist unabhängig von der Lipidausgangskonzentration und bei allen Seren gleich. Dies zeigt sich, wenn man die Verläufe der Extraktionskurven in einem bestimmten Abschnitt untersucht und miteinander vergleicht. In Abb. 7 ist der Kurvenverlauf dadurch charakterisiert, daß die zur Verminderung der Serum-Lipid-Konzentration um 10 mg% benötigte Äthermenge berechnet wurde und zwar im Bereich zwischen 20 - 60 mg% freiem, 40 - 90 mg% verestertem Cholesterin, 100 - 200 mg% Phospholipiden und 150 - 250 mg% veresterten Fettsäuren. Die Berechnung gilt für die Extraktion mit wasserfreiem Äther.

Bei der Betrachtung der Extraktionskurven muß die Fehlerbreite berücksichtigt werden, die durch die oben beschriebene Technik bedingt ist. Es sind in den Extraktionskurven jeweils die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angegeben; die Einzelwerte differieren zum Teil beträchtlich. Im Bereich niedriger Konzentrationen fällt diese Fehlermöglichkeit natürlich besonders ins Gewicht.

Wie Zöllner und Mitarbeiter (63) schon feststellten, ist es durchaus möglich, das gesamte Lipidmaterial mit Diäthyläther zu extrahieren, wenn oft genug und mit genügend großen Äthermengen ausgeschüttelt wird. Keinesfalls bleibt ein Lipid-

anteil bestimmter Größe zurück, der nicht mehr extrahierbar wäre. Auch beim Ausschütteln mit wassergesättigtem Äther zeigt die Extraktionskurve deutlich einen kontinuierlichen Abfall. Sicherlich lassen sich mit entsprechend großen Mengen wassergesättigten Äthers ebenfalls alle Lipide aus dem Serum entfernen.

Zusammenfassend kann über die Lipoidextraktion durch Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther folgendes gesagt werden:

- 1) Mit der Lipoidextraktion ist die Ausfällung und Denaturierung der Lipoproteide in der beschriebenen Mischung verbunden.
Es erscheint unmöglich, Lipide abzutrennen, ohne dabei die Molekülstruktur der Lipoproteide zu schädigen.
- 2) Die Ausfällung der Lipoproteide ist von der Konzentration des Lösungsmittels abhängig. Große cholesterinreiche Moleküle werden dabei bevorzugt angegriffen. Die Bildung der beschriebenen Mischphase ist, zumindest teilweise, ein Fraktionierungsvorgang für β -Lipoproteide. Die im Serum bzw. Serumrückstand zurückbleibenden Lipoproteide lassen sich elektrophoretisch nicht klar differenzieren. Zudem muß eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit durch die Behandlung des Serums mit dem Diäthyläther in Betracht gezogen werden.
- 3) Die Verteilung der Lipoproteide zwischen Serumphase und Mischphase ist allein von der Höhe der Lipoidkonzentration im Serum bzw. vom Fettreichtum der Moleküle, namentlich von ihrem Gehalt an verestertem Cholesterin, abhängig.
- 4) Die Lösung der Lipide im Äther ist ein Verteilungsvorgang, der von der Affinität zu den Serumbestandteilen einerseits und dem hydrophoben Lösungsmittel andererseits bestimmt wird.
- 5) Rückschlüsse auf Unterschiede der Bindungsstabilität von Lipoproteidkomplexen verschiedener Seren bei gleich hoher Lipoidkonzentration ergeben sich nicht. Alle Ergebnisse der Lipoidextraktion durch Ausschütteln des Serums mit Äther lassen sich mit jenen Befunden korrelieren, die durch die üblichen Standardmethoden der quantitativen Lipoidanalyse und der Elektrophorese bereits erhoben werden können.
- 6) Insbesondere lassen sich keine Unterschiede zwischen dem Verhalten normaler Seren und Seren von arteriosklerotischen Patienten aufzeigen.

Es ist in diesen Versuchen nur das Verhalten der Lipoproteide beim Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther genauer untersucht worden. Da sich bei Verwendung anderer hydrophober Lösungsmittel aber eine gleichartige Mischphase bildet, darf angenommen werden, daß die Lipoproteide dabei in gleicher Weise angegriffen werden.

III. ELUTION DER LIPOIDE AUS ELEKTROPHORETISCH GETRENNTEN LIPOPROTEIDEN MIT HEXAN

1) Grundlagen

Der Extraktion der Lipide durch Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther geht die Denaturierung der Lipoproteide in der beschriebenen Mischphase voraus. Es zeigt sich, daß die Lipide trotzdem noch relativ fest in den Molekülkomplexen gebunden sind und nur in jeweils kleinen Mengen herausgelöst werden. Ob und welche Unterschiede im Verhalten der einzelnen Lipoproteidfraktionen bei der Extraktion auftreten, läßt sich durch die elektrophoretische Untersuchung der Mischphase nicht mehr feststellen, da die denaturierten Lipoproteide aus allen Fraktionen unbeweglich am Startpunkt liegenbleiben und so nicht mehr differenziert werden können. Um diese Frage beantworten zu können, müßten die Lipoproteide bereits vor dem Ausschütteln fraktioniert werden.

Man könnte die Fraktionen durch Papierelektrophorese trennen, die Elektrophoresestreifen dann zerschneiden, das auf den einzelnen Abschnitten abgelagerte Material eluieren und die entstehenden Lösungen mit Diäthyläther ausschütteln. Einfacher und im Prinzip dasselbe wäre es, die Streifenabschnitte direkt in einem Gefäß mit Äther auszuwaschen. In dieser Ätherlösung ließen sich die Lipide dann quantitativ, andererseits die nicht extrahierten Lipide färbereich auf dem Streifen bestimmen. Dieses Vorgehen entspräche im Prinzip der Versuchsanordnung von Edel (16) oder Benhamou (5), die eine "Phospholipidelektrophorese" ausarbeiteten. Sie spülten die Elektrophoresestreifen in einem Lösungsmittelgemisch aus, dessen Zusammensetzung sie so wählten, daß die Phosphatide nicht gelöst und als Rückstand auf dem Papier anfärbbar wurden.

Die Fehlerbreite bei der quantitativen Bestimmung der Lipide aus der Ätherlösung erwies sich stets als so erheblich, daß die Ergebnisse nicht zu verwerten waren. Die Ursache dafür ist einmal darin zu suchen, daß bei der elektrophoretischen Auftrennung nur eine sehr geringe Serummenge (0,02 ml) aufgetragen werden kann - entsprechend niedrig sind die Konzentrationen im Eluat -, zum anderen, daß ein Teil der Lipide am Papier adsorbiert wird. Auch lassen sich die Fraktionen durch Zerteilung der Papierstreifen nicht immer exakt voneinander abgrenzen. Es erschien deshalb vorteilhafter, auf die quantitative Bestimmung zu verzichten, die Streifen unzerlegt zu lassen und nur die Restkonzentrationen auf dem Papier durch Anfärben zu ermitteln, auch wenn dabei die einzelnen Lipoidfraktionen nicht differenziert werden können. Nachteilig wirkt sich hier ebenfalls wieder die Adsorption von Lipiden am Papier aus sowie die Notwendigkeit, große Lösungsmittelmengen zur

Elution zu verwenden. Zahlenmäßige Vergleiche zwischen Ausgangs- und Restkonzentration sind nicht möglich.

Als wesentliche Verbesserung der Methodik erscheint deshalb folgendes Vorgehen: die Elektrophorese wird auf großen quadratischen Papierbögen ausgeführt, auf denen sie nur eine schmale Zone am Rand beansprucht; das Papier wird nicht mehr ganz in das Lösungsmittel eingelegt, sondern lediglich mit einer Seite in eine Wanne eingetaucht, die das Lösungsmittel enthält, so daß dieses Papier emporgesaugt wird und in kontinuierlichem Strom an den darauf deponierten Substanzen vorbeifließt. Aus den Lipoproteiden werden dabei Lipide abgetrennt, durch das emporsteigende Lösungsmittel mitgeführt und an anderer Stelle wieder abgelagert. Sie lassen sich wie die zurückbleibenden Substanzen anfärben. Da jetzt auf dem Papier das gesamte Lipoidmaterial wie im Ausgangselektropherogramm auf dem Papier bestimmt wird, läßt sich die Verteilung vor und nach der Extraktion zahlenmäßig vergleichen.

Die Verteilung ist, wie zu erwarten, unterschiedlich, je nachdem, welches Lösungsmittel verwendet wird. Die meisten Lösungsmittel transportieren die abgetrennten Lipide als einheitliche Fraktion unmittelbar an ihrer Front. Überraschend war, daß bei Verwendung reinen n-Hexans über den α - wie über den β -Lipoproteiden je zwei verschieden starke Fraktionen in unterschiedlicher Entfernung von der Lösungsmittelfront ausgebildet wurden. Dieses Phänomen wurde deshalb näher untersucht.

Es zeigte sich, daß eine Trocknung des Papiers bei niedriger Temperatur (+ 60 °C) keinen Einfluß auf die Extraktion hatte.

Auf einem Papier von der Abmessung 30 x 30 cm² wurde zunächst die Elektrophorese durchgeführt. Das zu untersuchende Serum wurde dabei in zwei jederseits 3 cm vom Papierrand entfernten Strichen aufgetragen (Abb. 8, A). Nach der Auftrennung wurde das Papier bei + 60 °C getrocknet und dann mit einer Seite in eine Wanne mit Hexan eingehängt. Das Hexan stieg an ihm empor, senkrecht zur Laufrichtung der Elektrophorese, über die Bahn der einen elektrophoretischen Auftrennung hinweg. Die Front wurde etwa 3 cm vor der anderen Elektrophoresebahn zum Stehen gebracht. Nach Trocknung bei + 60 Grad und Färbung mit Sudanschwarz stellten sich je zwei Fraktionen über den α - wie über den β -Lipoproteiden mit dem Fettrest dar.

Sie wurden mit X_{α} , Y_{α} und X_{β} , Y_{β} bezeichnet (Abb. 8, B).

Wurde das Papier nach der Trocknung nicht gefärbt, sondern um 90 Grad gedreht, und zum zweiten Mal in Hexan eingetaucht, so lief die Front des Lösungsmittels nun über beide Elektrophoresebahnen und über die bereits abgetrennten Fraktionen hinweg. Sie wurde knapp unter dem jenseitigen Papierrand gestommt. Das Ergebnis der Färbung zeigt Abb. 8, C. X_{α} und X_{β} sowie Y_{α} und Y_{β} waren zu je zwei Flecken X und Y zusammengelaufen, von den Lipoproteiden der bislang

nicht überspülten Elektrophoresebahn waren ebenfalls zwei gleichartige Fraktionen X und Y abgetrennt worden, deren Farbintensität den anderen Flecken jeweils entsprach; von den bereits überspülten Lipoproteiden der anderen Bahn waren keine weiteren Anteile mehr gelöst worden.

Die auf der Bahn der Elektrophorese an ihrem ursprünglichen Ort zurückgebliebenen Lipoidanteile wurden nach ihrer Herkunft mit α' , β' und F' bezeichnet.

Die Auftrennung mußte natürlich in einer geschlossenen, mit den Lösungsmitteldämpfen gesättigten Kammer durchgeführt werden.

Um die auf dem Papier verteilten Lipide auch quantitativ bestimmen zu können, wurde in einer anderen Versuchsreihe das Papier nach der zweimaligen Behandlung mit Hexan, wie sie oben beschrieben ist, in einzelne Abschnitte zerteilt; die Lokalisation der Lipoidanteile war vorher durch Anfärbung eines Vergleichspapiers ermittelt worden. Die Papierabschnitte wurden in Äthanol-Äther (3 : 1) mehrfach unter kurzem Aufkochen gewaschen. Aus diesen Äthanol-Äther-Lösungen wurden die Lipide quantitativ mit den unter II, 2 angegebenen Methoden analysiert. Durch Vergleich der ermittelten Gewichtsmengen mit den im Ausgangsserum bestimmten Konzentrationen konnte die fiktive Verteilung im Serum berechnet werden, so daß eine Angabe in mg% möglich wurde.

Diese Werte sind in der Tabelle der Abb. 9 angegeben.

Die mit Hexan abgetrennten Fraktionen X und Y erwiesen sich beim Versuch der Anfärbung mit Bromphenolblau als eiweißfrei. Auch mit der Methode von Strauch ließ sich im Eluat von X und Y kein Eiweiß nachweisen. In X und Y konnten nur in wenigen Fällen Spuren von freiem Cholesterin oder von Phospholipiden nachgewiesen werden. Die Darstellung von Phospholipoiden in X und Y auf dem Papier mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens und von freien Fettsäuren als Kupferseifen (13, 24) gelang nicht.

Es darf also angenommen werden, daß das Hexan lediglich Cholesterinester und Neutralfette aus den Lipoproteiden löst und abtransportiert. In den α -Lipoproteiden bleibt relativ mehr Lipoid zurück als in der β -Fraktion. Dabei wird fast das gesamte veresterte Cholesterin aus letzterer Fraktion ausgewaschen.

Die selektive Abtrennung von Cholesterinester und Neutralfetten könnte erklärt werden durch die unterschiedliche Art der Bindung zwischen den Trägerproteinen und den Lipoidbausteinen. Die nicht ionisierten weniger fest gebundenen Ester werden zwischen den lipophilen Anteilen der Lipoproteidreste und dem lipophilen Lösungsmittel leicht ausgetauscht. Der Austausch erfolgte dann nach Maßgabe der Affinität; diese ist bei den α -Lipoproteiden wegen ihres höheren Gehaltes an Phosphatiden stärker, so daß vergleichsweise geringere Ester-Anteile in das Hexan übergehen. Daß die Lipoproteidreste für das Zurückbleiben der Lipide verantwortlich sind, geht aus folgender Tatsache hervor: Wird ein Äthanol-Extrakt des Serums auf einen Streifen aufgetragen und mit Hexan aufgetrennt,

so bleiben am Start fast keine anfärbbaren Substanzen zurück. Es werden auch wieder zwei Fraktionen ausgebildet, deren Verhältnis zueinander jetzt aber anders ist; Y nimmt gegenüber X an Stärke wesentlich zu, in ihm sind Phospholipide wie freie Fettsäuren nachweisbar.

Zur Ausführung der Elektrophorese wird das Papier zunächst mit einem Veronal-Puffer durchtränkt. Es interessierte, welchen Einfluß diese Pufferung, sowie die Elektrophorese selbst auf die folgende Auftrennung mit Hexan ausüben. Auf mehreren Papieren, die teils mit der Pufferlösung angefeuchtet und dann getrocknet, teils frei von Veronal waren, wurden je 2 ml Serum aufgetragen und ohne vorhergehende Elektrophorese mit Hexan aufgetrennt. Auf jedem Papier waren zwei Fraktionen zu beobachten, die dieselben Anteile an abgetrennten Lipiden enthielten wie nach vorhergehender elektrophoretischer Fraktionierung der Lipoproteide.

Das entwickelte Verfahren entspricht im Prinzip der bei der Chromatographie angewendeten Technik. Allerdings werden zur chromatographischen Auftrennung von Lipiden Spezialpapiere, meist mit Imprägnation, und Lösungsmittelgemische mit einer lipophilen und lipophoben Phase benutzt (24). Allein bei der sog. Adsorptionschromatographie wird mit nur einer Lösungsmittelphase gearbeitet. Die Auftrennung beruht auf der stetigen Gleichgewichtseinstellung zwischen den an der Faser Oberfläche der festen Phase (dem Papier) adsorbierten Molekülen und jenen, die in der durchlaufenden Flüssigkeit gelöst sind. Zur Identifizierung von Substanzen aus Substanzgemischen wird die Geschwindigkeit des Transportes und demnach die Lokalisation auf dem Papier herangezogen. Solche, die bei konstanten Versuchsbedingungen, vor allem was die aufgetragene Menge des Gemisches betrifft, gleich schnell laufen, können als identisch angesehen werden. Normalerweise müssen die zu trennenden Gemische vorher sorgfältig aufbereitet werden. Eine derartige Aufbereitung sollte in unserem Fall aber gerade vermieden werden, da ja die Ablösungsrate der Lipide interessierte.

An der Lösungsmittelfront werden bei der Adsorptionschromatographie häufig noch Gemische aus mehreren Komponenten mitgeführt. Nur die zwischen Startpunkt und Front an verschiedenen Orten abgelagerten Substanzen entsprechen chemisch-reinen Fraktionen. X und Y enthalten beide, wie aus der quantitativen Analyse hervorgeht, verestertes Cholesterin und veresterte Fettsäuren in unterschiedlicher Zusammensetzung. Wenn man die Ölsäure als Berechnungsgrundlage nimmt, so entspricht der Fettsäuregehalt der Fraktion X in etwa dem Fettsäureanteil der dort abgelagerten Cholesterinester:

Cholesterin	$\text{C}_{27} \text{H}_{46} \text{O}$	Molekulargewicht 386
Ölsäure	$\text{C}_{18} \text{H}_{34} \text{O}_2$	" 282.

Der Quotient hat eine Größe von 1,37. Wir finden bei A (Tab. Abb. 9) den Quotienten 1,33. bei B 1,29. bei C 1,27. bei D 1,62. bei E 1,45. Es ist also

zu vermuten, daß die Fraktion X nur Cholesterinester und die Fraktion Y neben Cholesterinestern den gesamten Anteil an Neutralfetten enthält. Leider standen keine synthetischen Ester zur Verfügung, um die Fraktionen weiter zu differenzieren.

Es bleibt damit die Frage offen, warum ein Teil der abgetrennten Cholesterinester in X abgelagert, ein anderer Teil vermischt mit Neutralfetten an der Front mitgeführt wird. Man kennt eine große Zahl durch ihren Fettsäureanteil unterschiedlicher Cholesterinester ⁺⁾ , deren Löslichkeitseigenschaften durch diesen Anteil wesentlich beeinflusst werden; es wäre denkbar, daß eine bestimmte Fraktion von Estern gleicher oder nur gering unterschiedlicher Löslichkeit von den übrigen getrennt in X abgelagert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Neutralfette und Cholesterinester zum Teil noch miteinander verbunden sind und deshalb als einheitliche Fraktion Y von den reinen Cholesterinestern in X separiert werden.

Es erscheint interessant, mit der so erarbeiteten Methode eine größere Reihe von Seren zu untersuchen. In erster Linie sollte dabei klar werden, ob Unterschiede in der Extraktibilität der Lipide aus den verschiedenen Lipoproteidfraktionen bestehen. Darüberhinaus konnte erwartet werden, daß die Auftrennung der extrahierten Lipide in zwei Fraktionen neue Aspekte eröffnen würde.

Im Gegensatz zur Extraktion durch Ausschütteln des Serums mit Äther trennt das Hexan die ihm erreichbaren Lipide bereits bei einmaliger Elution quantitativ ab. Eine Elution des gesamten Lipoidmaterials aus den auf dem Papier deponierten Lipoproteiden ist offensichtlich nicht möglich.

Zwischen den Lipoproteidfraktionen werden keine Lipide ausgetauscht; es erschien deshalb möglich, auf die komplizierte Trennung auf großen Papieren zu verzichten und die normalen, drei Zentimeter breiten Elektrophoresestreifen zu benutzen. Dabei steigt das Hexan an dem Papier, auf dem vorher die Elektrophorese durchgeführt worden ist, empor, zunächst über die α -, dann über die β -Lipoproteide hinweg, seine Laufrichtung ist also der der Elektrophorese entgegengesetzt. Auf dem Streifen bleibt noch genügend Platz für die Ablagerung der Fraktionen X und Y. Es wurde keine quantitative Analyse der Lipide durchgeführt, sondern nur eine Anfärbung auf dem Papier mit Sudanschwarz. Das erschien für eine erste Orientierung ausreichend, da X und Y relativ homogene Fraktionen sind.

2) Methodik

Das morgens von nüchternen Probanden entnommene Blut wurde zur Gerinnung 1 Std. stehen gelassen, dann 2 x 20 Minuten lang bei 3500 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Das abgetrennte Serum wurde innerhalb der nächsten 6 Stunden weiter verarbeitet.

⁺⁾ s. a. (56)

a) Elektrophorese: Die Elektrophorese wurde in einer Durrumzelle der Fa. Beckmann nach deren Anleitung ausgeführt. Die Auftrennung wurde in der gleichen Weise wie unter II, 2 beschrieben, ausgeführt. Zwei Papierstreifen wurden danach sofort gefärbt, zwei andere für die Auftrennung mit Hexan aufgehoben.

b) Auftrennung mit Hexan: Für die Elektrophorese war das zu untersuchende Serum in der Mitte des 30,5 cm langen und 3 cm breiten Streifens aufgetragen worden. Die Länge der Trennstrecke betrug etwa 10 cm. Nach der Elektrophorese wurde das Papier dreißig Minuten bei 60 °C getrocknet und dann in eine abgedeckte Wanne mit Hexan eingehängt. Diese Wanne war 40 cm lang, 20 cm breit und 35 cm hoch. An den beiden längeren Wänden wurde steifer Filterkarton in Ziehharmonikaform aufgestellt, um die stetige Feuchtigkeit der Kammer zu garantieren. In der Wanne stand das Hexan etwa 4 cm hoch. Die Streifen wurden an einem Glasstab befestigt und mit dem der Laufrichtung der Elektrophorese entsprechenden Ende in das Lösungsmittel eingetaucht. Dieses wanderte innerhalb von 75 bis 90 Minuten an dem Papier empor, über die auseinandergezogene Proteinfraction hinweg, bis 13 cm über den Startpunkt der Elektrophorese hinaus. Das Ende der Front war vor dem Versuch markiert worden (Abb. 10, 11).

c) Färbung: Die Streifen wurden mit Sudanschwarz gefärbt. Vorher waren sie bei 120 °C getrocknet worden, nach der Elektrophorese 30 Minuten, nach der kombinierten Auftrennung 5 Minuten. Dann wurden sie für drei Stunden in eine frisch angefertigte gesättigte Lösung von Sudanschwarz in 60%igem Äthanol eingelegt, danach zweimal je 15 Minuten in 50%igem Äthanol gespült.

d) Auswertung: Die Streifen wurden im "Analytrol" der Fa. Beckmann ausgewertet. Dieses Gerät mißt die Intensität der Färbung und stellt die Verteilung kurvenmäßig dar; gleichzeitig berechnet es die Kurven planimetrisch. Der Kurvenverlauf wurde mit dem gefärbten Streifen verglichen und jede Fraktion nach Maßgabe der Gaußschen Kurve von den anderen abgetrennt. Die Anteile der einzelnen Fraktionen sind in Prozent der Gesamtintensität angegeben, da eine quantitative Aussage über den Lipidgehalt auch bei Mitfärben einer Vergleichssubstanz nicht erlaubt ist (s. u.).

e) Vergleichende Serum-Cholesterinbestimmung: In allen untersuchten Seren wurde die Konzentration des Gesamtcholesterins nach Zack (61) bestimmt.

f) Kontrolle des Serumeiweißbildes: Für die Eiweißelektrophorese wurden 0,006 ml Serum aufgetragen, ebenfalls zwanzig Stunden unter den oben angegebenen Bedingungen aufgetrennt und dann mit Bromphenolblau in reinem Methanol gefärbt. Auswertung ebenfalls im "Analytrol".

Bei der durchgeführten Reihenuntersuchung wurden von jedem Probanden zwei Streifen für die kombinierte Auftrennung angelegt und zwei Streifen für die Lipoproteidelektrophorese. Die in der Tabelle der Abb. 14 angegebenen Werte

entsprechen jeweils den Mittelwerten aus einer solchen Doppelbestimmung.

Der untersuchte Personenkreis wurde in drei Gruppen gegliedert:

Gruppe I: 40 Männer zwischen 40 und 54 Jahren, bei denen keine Befunde für eine Stoffwechselstörung, infektiöse Erkrankung oder für atherosklerotische Veränderungen sprachen. Ihre Eiweißelektropherogramme waren gegenüber der Norm nicht verändert, ihre Serum-Cholesterinwerte altersentsprechend.

Gruppe II: 47 Männer zwischen 37 und 54 Jahren mit atherosklerotisch bedingten Herz- und Gefäßkrankheiten. Ihre Eiweißelektropherogramme zeigten teilweise leichte Veränderungen, ihre Serum-Cholesterinwerte waren teils normal, teils beträchtlich erhöht.

Gruppe III: 5 Männer zwischen 44 und 50 Jahren, die an Leberzirrhose litten. Ihre Eiweißelektropherogramme zeigten Veränderungen im Sinne einer Albuminerniedrigung, β - und γ -Globulinerhöhung, ihre Serum-Cholesterinwerte lagen teilweise erheblich über der Norm.

3) Ergebnisse

Die Einteilung der papierelektrophoretisch getrennten Lipoproteide weist in der Literatur erhebliche Unterschiede auf (9). Für die hier beschriebene Untersuchung wurde eine von Edel (16) angegebene Einteilung angewendet. Die am schnellsten wandernde Fraktion, meist im Bereich der Albumine und α_1 -Globuline anzu-treffen, ist als α -Fraktion bezeichnet, eine langsamer wandernde im Bereich der α_2 - und β -Globuline als β -Fraktion. Zwischen dieser und dem Startpunkt wird bei der erwähnten Technik eine dritte Fraktion beobachtet, die als Fettrest (F) beschrieben ist, da sie nach Nikkilä (45) hauptsächlich aus Neutralfetten (Chylomikronen) bestehen soll. Eine von Dangerfield und Smith (14) erstmals von den β -Lipoproteiden gesonderte Fraktion ist nach ihrer Lage als prae- β -Fraktion gekennzeichnet. Die prae- β -Fraktion trat gehäuft bei Gruppe II auf, was den Angaben in der Literatur entspricht (6, 16). Sie verhielt sich im übrigen völlig gleich wie die β -Fraktion und ist deshalb in den Tabellen und Diagrammen mit dieser zusammengefaßt.

Das Hexan trennt einen großen Teil der Lipoide von den Lipoproteiden ab. Die Rückstände, die in den einzelnen Fraktionen bleiben, sind nach ihrer Herkunft mit α' , β' und F' bezeichnet. Jenseits des Startpunktes der Elektrophorese werden die ausgewaschenen Lipoide in den beiden Fraktionen X und Y verteilt. Y stellt die näher zur Front hin abgelagerte Fraktion dar (Abb. 11). Beide sind nur zur Front zu scharf begrenzt. Die "Schwänze", die sie ausbilden, sind Folge einer nichtlinearen Separationsfunktion. Die stetige Gleichgewichtseinstellung zwischen den an der Faseroberfläche des Papiers adsorbierten Molekülen und den in der durchlaufenden Flüssigkeit gelösten ist bei höheren Konzentrationen dadurch gestört, daß ein relativ kleinerer Substanzanteil in der stationären Phase, dem

Papier, festgehalten wird (24). Es mußte aber eine relativ große Menge Serum aufgetragen werden, um eine brauchbare Anfärbung mit Sudanschwarz zu erzielen. Diese Färbung wurde gewählt, damit es möglich war, die Streifen im "Analytrol" auszuwerten und die Ergebnisse mit denen der Elektrophorese zu vergleichen.

Die relative Lage des Konzentrationsschwerpunktes einer Fraktion auf dem Papier ist von der Substanzmenge abhängig (24). Es wird hier zwar stets dieselbe Serummenge (0,02 ml) aufgetragen, die Lipoidkonzentration darin ist jedoch unterschiedlich. Die Fraktion Y, die ihren Konzentrationsschwerpunkt stets in der Nähe der Front hat, wird davon wenig betroffen, weit stärker aber X. Dadurch verschiebt sich die Distanzrelation der beiden Fraktionen, ausgedrückt in dem R_X -Wert. Dieser ist definiert als

$$R_X = \frac{\text{Entfernung Startpunkt zu X}}{\text{Entfernung Startpunkt zu Y.}}$$

Es wurde die Entfernung vom Startpunkt der Elektrophorese zur frontnahen scharfen Begrenzung der beiden Fraktionen gemessen, nicht wie sonst bei der chromatographischen Auftrennung üblich, die Entfernung zur Fleckenmitte, die wegen der erwähnten "Schwänze" nicht genügend genau festgestellt werden konnte.

Der R_X -Wert hat Bedeutung für die Identifizierung von Substanzen auf dem Papier. Daneben konnte ihm aber eine für die vorliegende Untersuchung wichtige weitere Rolle zugeordnet werden: Werden von demselben Serum unterschiedliche Mengen auf dem Papier aufgetragen, wobei demnach das Verhältnis der Lipidkomponenten zueinander gleichbleibt, so verändert sich die prozentuale Verteilung in den einzelnen Fraktionen nach der Auftrennung mit Hexan nicht; von der Gewichtseinheit der abgetrennten Lipide ist einzig der R_X -Wert abhängig; er steigt proportional mit deren Zunahme an (Abb. 12). Da R_X durch das Verhältnis der Wegstrecken von X und Y definiert ist, Y, das unmittelbar hinter der Front läuft, aber als Bezugspunkt angenommen wird, darf er spezifisch X zugeordnet werden. In gewissem Umfang erlaubt er also eine quantitative Aussage: die Menge der in X abgelagerten Cholesterinester läßt sich aus der Höhe des R_X -Wertes ungefähr abschätzen. Diese Aussage ist unabhängig von der Färbung und deren Fehlerbreite und sagt zunächst nichts über Y und dessen Verhältnis zu X aus.

Die Stärke einer Fraktion läßt sich sonst nur als prozentualer Anteil an der Gesamtfärbintensität angeben. Die quantitative Beurteilung von Lipidfraktionen mittels färberischer Methoden ist nicht zulässig, da der Anfärbung sehr komplizierte Wechselwirkungen zugrundeliegen (6, 7, 48, 52, 58, 59, 60). Berg (7) gibt für die Anfärbbarkeit der Lipide auf dem Papier mit Sudanschwarz folgende

Relationen auf: Bezogen auf

Neutralfette	= 100 % ;
freies Cholesterin	= 47,5 % ,
Cholesterinester	= 26,5 % ,
Phosphatide	= 28,0 % der Farbintensität.

Die Fraktionen der Neutralfette, Cholesterinester und Phosphatide sind in sich wieder nicht homogen. Schmelzpunkt und Zahl der Doppelbindungen sind für die Färbung von großer Bedeutung. So färbt sich z. B. Tristearin ($C_{18:0}$) achtmal schwächer an als Triolein ($C_{18:1}$). Auf die große Zahl verschiedener Cholesterinester wurde bereits hingewiesen. Die Bestimmung der Lipide durch Anfärbung ist also nicht sehr exakt. Die Fehlerbreite der Methode ist bei der kombinierten Auftrennung etwa gleich groß wie bei der Elektrophorese allein. Die R_x -Werte, die von der Färbung unabhängig sind, lassen sich wesentlich besser reproduzieren (siehe Tabelle Abb. 13). Werden Seren des gleichen Patienten, die im Verlauf einiger Tage entnommen wurden, untersucht, so verändern sich die meisten Werte sowohl bei der Lipoproteidelektrophorese wie bei der kombinierten Auftrennung beträchtlich; weitgehend konstant bleiben jedoch der R_x -Wert und der prozentuale Anteil der Fraktion X.

Da nach der aus Elektrophorese und Elution kombinierten Auftrennung dieselbe Lipoidmenge eines Serums auf dem Papier angefärbt wird wie nach elektrophoretischer Auftrennung allein, ist es gestattet, die Ergebnisse beider Methoden nach ihren Zahlenwerten miteinander zu vergleichen. Die insgesamt anfärbbare Lipoidmenge wird jedesmal als 100 % gerechnet, die Stärke einer Fraktion als Anteil von 100 (Elektrophorese : $\alpha + \beta + F = 100\%$; kombinierte Auftrennung:

$$\alpha + \beta' + F' + X + Y = 100\%.$$

In Tabelle III (Abb. 14) sind die Mittelwerte aller Bestimmungen angegeben, aufgeschlüsselt nach den drei oben beschriebenen Gruppen von Patienten, sowie die in den einzelnen Gruppen jeweils höchsten und niedrigsten Einzelwerte.

Die Zuordnung von Ereignissen der quantitativen Analyse und solchen der elektrophoretischen Auftrennung und solchen der elektrophoretischen Auftrennung und Färbung mit Sudanschwartz ist aus den bereits angeführten Gründen nicht ohne weiteres möglich. Auch bei Bestimmung der Gesamtlipoidkonzentration im Serum läßt sich nicht aussagen, welche Lipoidmenge in einer bestimmten Lipoproteidfraktion mitgeführt wird. Vergleichende Untersuchungen zeigen jedoch Gesetzmäßigkeiten auf wie die, daß eine Erhöhung des Serumlipoidspiegels mit einer Verstärkung der langsam wandernden Lipoproteidfraktion in der Elektrophorese verbunden ist (9). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Gesamtcholesterinkonzentration der einzelnen Seren bestimmt. Der Anstieg dieser Gesamtcholesterinkonzentration steht deutlich mit einer Änderung der Verteilung zugunsten der fettreichen Lipoproteide in Beziehung (Abb. 15). In den mittleren Bereichen ist

ist die Beziehung jedoch nicht klar zu definieren. Abgrenzbare Unterschiede im Verhalten der Seren aus den einzelnen Gruppen lassen sich nicht finden. Eine Beobachtung, die sich in den Zahlenwerten nicht ausdrücken läßt, ist die, daß die α -Fraktion bei hohem Cholesterinspiegel nicht nur durch die veränderte Relation zu den anderen Lipoproteiden geringer wird, sondern auch absolut gegenüber der Norm schwächer ausgeprägt erscheint. Dies haben auch andere Autoren bereits hervorgehoben (9).

4) Diskussion

Der Anteil der insgesamt von den Lipoproteiden losgelösten Lipide, also der Fraktionen X und Y, schwankt zwischen 48 und 78 %. Die Mittelwerte der Gruppen II und III sind gegenüber der Norm (I) mäßig erhöht. Dies erklärt sich sofort, wenn die Einzelwerte zur Lipoproteidverteilung nach elektrophoretischer Auftrennung in Beziehung gesetzt werden; sie steigen gleichsinnig mit den Ausgangswerten der fettreichen Lipoproteidfraktionen an (Abb. 17), die bei Gruppe II und III höher liegen.

Die Lipoidverteilung in α , β und Fettrest nach Elution mit Hexan läßt eine für jede Fraktion unterschiedliche Beziehung zum Ausgangswert erkennen. In der α -Fraktion bleiben umso mehr Lipide (α') zurück, je höher der Ausgangswert (α) war (Abb. 17). Zwar werden aus einer stark ausgeprägten α -Fraktion relativ größere Anteile abgetrennt als aus einer schwach ausgeprägten, aber das Verhalten ist grundsätzlich anders als bei den β -Lipoproteiden und dem Fettrest.

In diesen beiden Fraktionen ist der zurückbleibende Lipoidanteil nach Elution (β' bzw. F') kleiner als bei niedrigem. Die Zuordnung ist bei den β -Lipoproteiden weniger deutlich als bei dem Fettrest. Daß bei diesem überhaupt nach der Elution noch Lipide nachweisbar sind, widerspricht an sich den Erwartungen, denn er soll ja hauptsächlich Chylomikronen enthalten, also Partikel mit verschwindend geringem Eiweißanteil. Die Adsorption von Lipiden am Papier dürfte dafür kaum verantwortlich zu machen sein, denn eine auf dem Papier aufgetragene Triolein-Lösung wird durch das Hexan gänzlich ausgewaschen.

Daß aus den α -Lipoproteiden relativ weniger Lipide abgelöst werden, hängt wohl mit ihrem hohen Phosphatidgehalt zusammen. Es muß auch die schon erwähnte Beobachtung berücksichtigt werden, wonach absolute und relative Abnahme der α -Fraktion miteinander verknüpft sind.

Will man das Verhalten der Lipoproteidfraktionen bei der Elution richtig beurteilen, so muß man einen Anhalt finden, nach dem sich die Gewichtsmengen an Lipiden abschätzen ließen, die in jeder Fraktion mitgeführt werden. Eine genaue Bestimmung dieser Lipoidmengen wäre nur durch die quantitative Analyse möglich. Es wurde aber bereits ausgeführt, daß durch die Berechnung des R_x -Wertes Zu- oder Abnahme

der Lipoidmenge in der Fraktion X unabhängig von der Färbung und der prozentualen Verteilung festzulegen sind. Ist aber eine der Fraktionen in dieser Art festgelegt, so kann aus der prozentualen Verteilung auch die mengenmäßige Veränderung in den anderen Fraktionen berechnet werden, wobei allerdings die Einschränkung zu beachten ist, die in der verschiedenen Anfärbbarkeit der einzelnen Lipide begründet liegt.

Aus dem prozentualen Anteil der langsam wandernden Lipoproteide läßt sich ebenfalls ein gewisser Rückschluß auf die Gesamtlipoidkonzentration ziehen. Beide steigen ungefähr proportional zueinander an; mit ihnen müßte auch der R_x -Wert größer werden, wenn vorausgesetzt wird, daß der Anteil der Fraktion X gleich bleibt. Tatsächlich zeigt sich auch eine solche Abhängigkeit, wenn man die R_x -Werte den Prozentwerten der fettreichen Lipoproteidfraktion zuordnet (Abb. 20).

Die Verteilung der eluierten Lipide auf die Fraktionen X und Y bleibt jedoch bei einer Veränderung der Gesamtlipoidkonzentration im Serum nicht konstant. Die gewichtsmäßige Zunahme der Fraktion X (R_x -Wert) ist mit deren anteilmäßiger Zunahme (X %) verbunden (Abb. 21).

Im Verhältnis dazu nimmt die Fraktion Y ab (Abb. 22), jedoch nicht im selben Maße, so daß dennoch ein Anstieg der Gesamtelutionsrate (X% + Y%) resultiert (Abb. 23).

Nach den hier dargelegten Abhängigkeitsverhältnissen läßt sich in einem Schema die Veränderung der prozentualen Verteilung in der Zuordnung zum R_x -Wert darstellen (Abb. 24 a). Diesem ersten ist ein zweites Schema gegenübergestellt, das die Änderung der gewichtsmäßigen Verteilung auf die einzelnen Fraktionen verdeutlicht, so wie sie sich nach Maßgabe des R_x -Wertes berechnen läßt (Abb. 24 b).

Anders als bei der Lipoidextraktion durch Ausschütteln des Serums mit Äther ist die nach der Elution mit Hexan an den Lipoproteiden noch zurückbleibende Lipoidmenge nicht konstant.

Wie die quantitative Analyse der in X abgelagerten Lipide vermuten läßt, enthält diese Fraktion lediglich Cholesterinester. Widersprüchlich ist nun die stete Zunahme der Fraktion X gegenüber Y bei hoher Gesamtlipoidkonzentration. Wenn man die Untersuchungen von Berg (6) zugrundelegt, müßte sich die Fraktion Y, die ja Neutralfette in großer Zahl enthält, in jedem Falle wesentlich stärker ausprägen. Da die Cholesterinester jedoch sehr unterschiedliche Fettsäureanteile besitzen und sich dementsprechend sehr verschieden anfärben lassen, ist es fraglich, ob man diese Untersuchung hier verwerten darf. Es könnte angenommen werden, daß X eine Fraktion besonders gut anfärbbarer Cholesterinester enthält.

Nach den Ergebnissen der kombinierten Auftrennung lassen sich bestimmte Gruppen von Patienten auf Grund besonderer Merkmale nicht voneinander abgrenzen. Die

Werte aus Gruppe II und III finden sich entweder im Streubereich der Gruppe I oder verändern sich gleichsinnig mit dem Ausgangswert. Die Beurteilung der Methode ergibt wieder, daß keinerlei Abweichungen vom Normalverhalten als typisch für atherosklerotische Erkrankungen erkennbar werden, die nicht durch quantitative Analyse oder Elektrophorese bereits festzulegen wären. Lediglich die Veränderung des Lipidspektrums ist somit durch die Standardmethoden nicht zu bestimmen. Da aber auch sie von der Gesamtlipoidkonzentration abhängt, ist ihre Ermittlung nur von theoretischem Interesse.

Durch Ausbau der sehr einfachen und praktischen Methode müßte es sich ermöglichen lassen, die einzelnen Cholesterinester und Glyceride auf dem Papier zu isolieren. Hier besteht somit noch eine Möglichkeit, ohne großen Aufwand wichtige Erkenntnisse zu sammeln.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird zunächst über Methoden und Probleme der Strukturaufklärung der Lipoproteide berichtet. Die Stabilität der Bindung zwischen Protein und Lipoid ist möglicherweise von großer Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose. Um diese Bindungsqualität zu prüfen, haben verschiedene Autoren die Abtrennbarkeit der Lipoide durch hydrophobe Lösungsmittel untersucht. Sie gingen dabei von der Hypothese aus, daß durch schonende Behandlung des Serums mit hydrophoben Lösungsmitteln weniger feste Bindungen der Lipoide im Lipoproteidkomplex gelöst würden, wobei der Eiweißanteil ungeschädigt bliebe. Aus der Menge dieser schonend abgetrennten Lipoide wären dann Rückschlüsse auf die Bindungsstabilität möglich.

Von den verschiedenen angegebenen Methoden wurde eine der einfachsten, nämlich die Extraktion der Lipoide durch Ausschütteln des Serums mit Diäthyläther, ausgewählt. Es sollte untersucht werden, ob diese Technik die Vorbedingungen erfüllt, zum anderen, ob die Ergebnisse, die mit ihr erzielt werden, einen Hinweis auf Veränderungen geben können, die für die Atherosklerose typisch sind und durch Standardmethoden, nämlich quantitative Analyse und Lipoproteid-elektrophorese, nicht aufgedeckt werden.

Sehr verschiedene Einwirkungen des Äthers auf die Lipoproteide überlagern sich bei der Extraktion. Es wird gezeigt, daß die Lipoidabtrennung stets mit einer Denaturierung der Lipoproteide verbunden ist. Die unterschiedlichen Extraktionsergebnisse bei einer Gruppe von Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen gegenüber einer Vergleichsgruppe gesunder Personen können auf Veränderungen der jeweiligen Ausgangswerte zurückgeführt werden. Irgendwelche neuartigen Tatsachen sind mit der ausgewählten Methode nicht aufzudecken.

Mit einer Methode, die eine Kombination von elektrophoretischer Auftrennung und Auftrennung nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie darstellt, wird dann versucht, Aufschlüsse über die Extraktibilität der Lipoide aus definierten Lipoproteidfraktionen zu gewinnen. Es wird auf demselben Papier zunächst eine Elektrophorese und dann eine Elution der Lipoide mit n-Hexan durchgeführt. Bei der Trocknung des Papiers nach der Elektrophorese zerfallen die Molekülkomplexe wahrscheinlich soweit, daß deren weniger fest an Eiweiß gebundene Fettbestandteile von dem lipophilen Lösungsmittel abgetrennt werden können; es sind dies Cholesterinester und Neutralfette. Sie werden in zwei neue Fraktionen verteilt, von denen eine nur Cholesterinester, eine Cholesterinester und Neutralfette enthält. Die Lipoproteidfraktionen lassen bei der Elution ein unterschiedliches Verhalten erkennen. Die Besonderheiten der Extraktibilität sind aber

auch hier wieder mit Veränderungen der Ausgangswerte im Elektropherogramm zu korrelieren. Ebenso können die beiden aus abgetrennten Lipoiden bestehenden Fraktionen in Beziehung zu dem Elektrophoresebefund gebracht werden. Über bereits Bekanntes hinausgehende Zusammenhänge sind also auch mit dieser Methode nicht zu finden. Das Verhalten der α - und β -Lipoproteide bestätigt die Beobachtungen anderer Autoren.

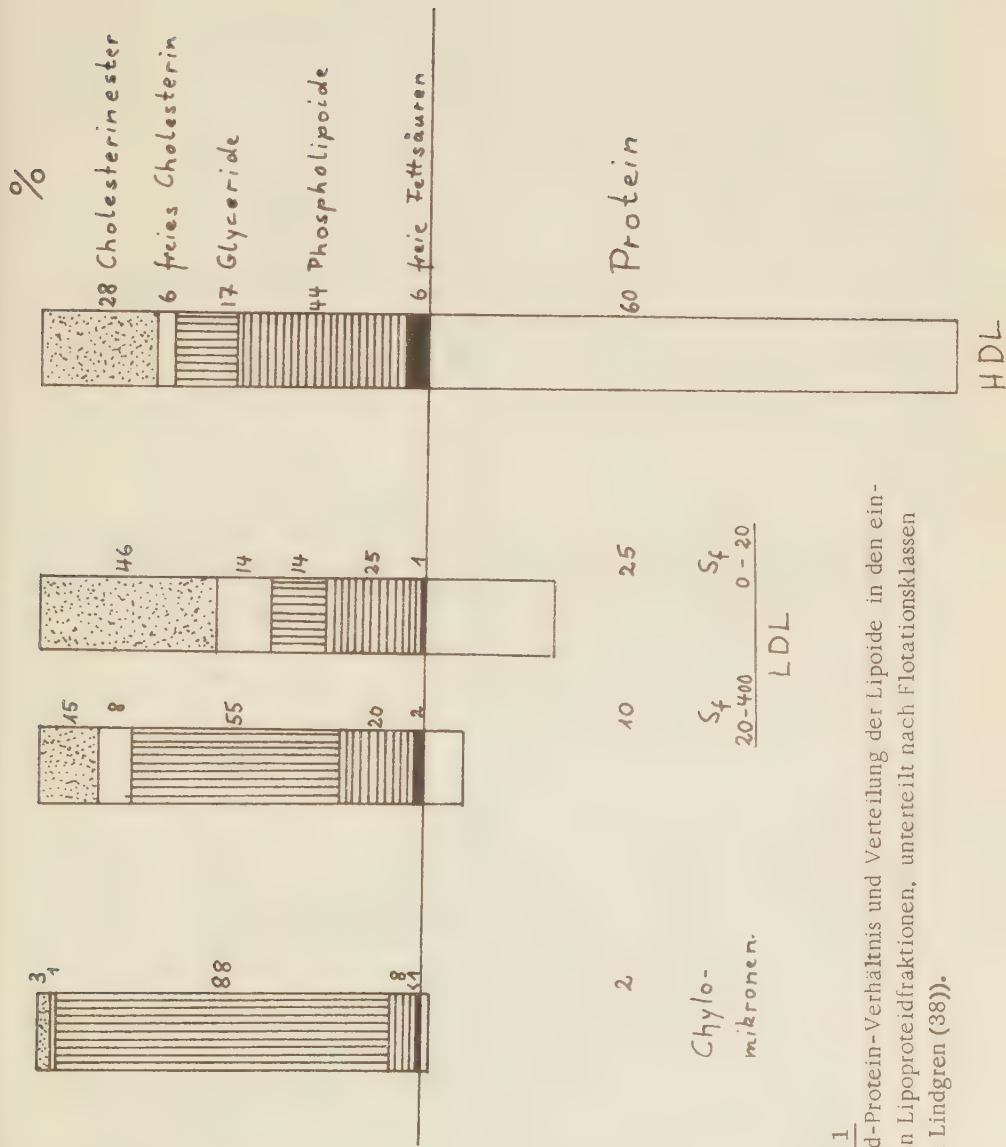
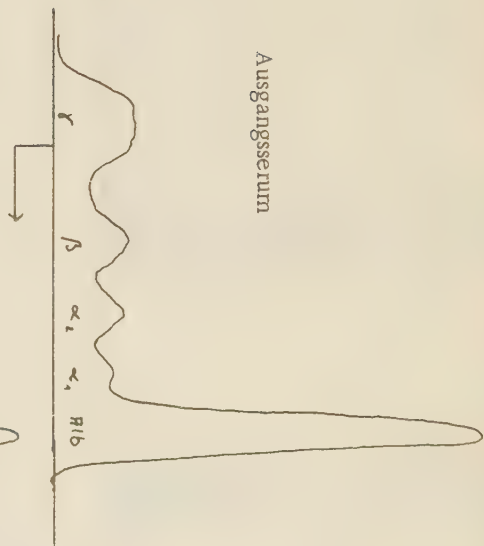


Abb. 1

Lipoid-Protein-Verhältnis und Verteilung der Lipide in den einzelnen Lipoproteidfraktionen, unterteilt nach Flotationsklassen (nach Lindgren (38)).

Ausgangsserum



Serumphase

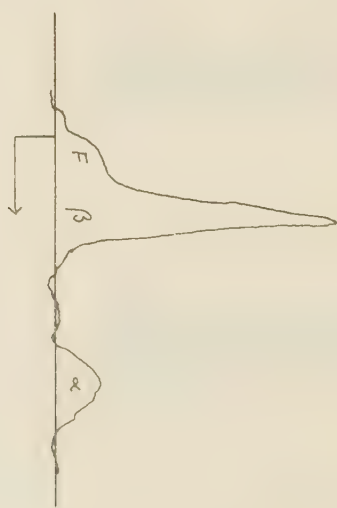
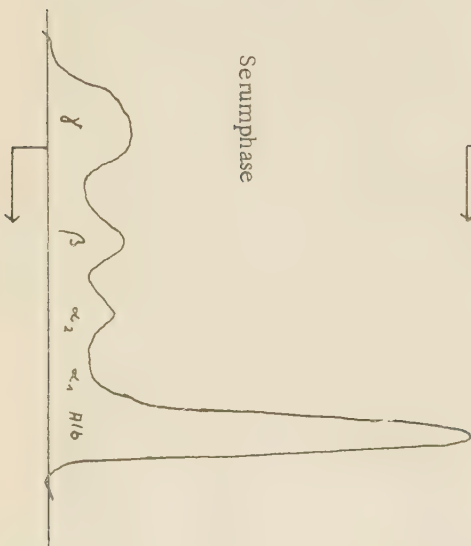


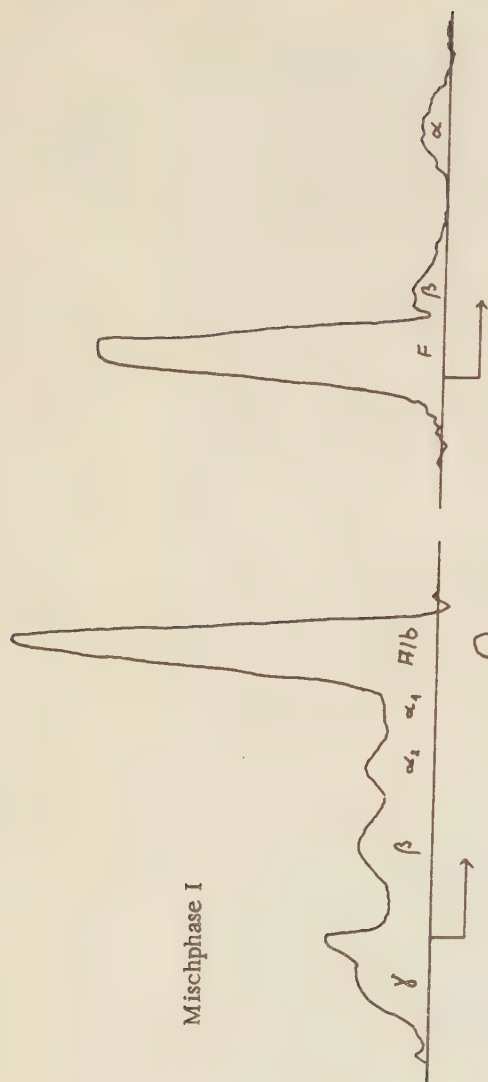
Abb. 2

Fortsetzung und

Legende s.

S. 41 und 42

Mischphase I



Mischphase II

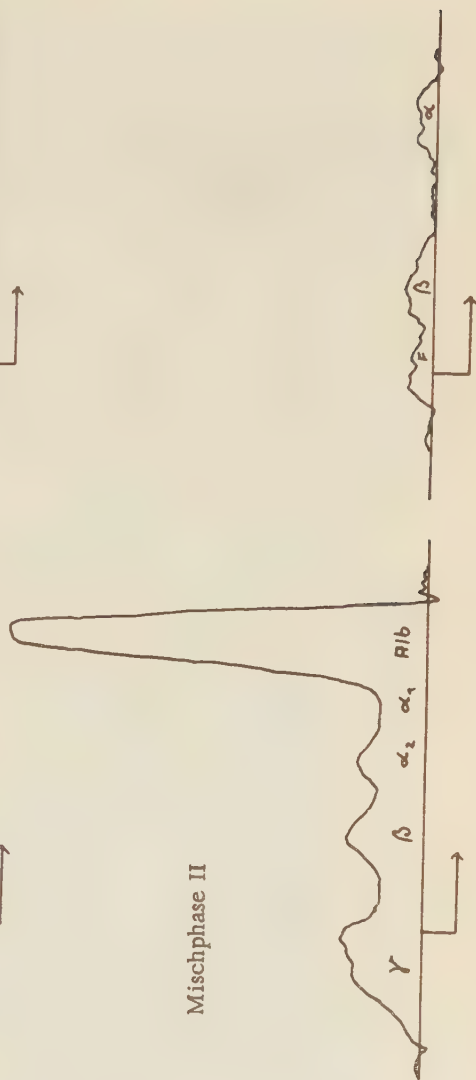


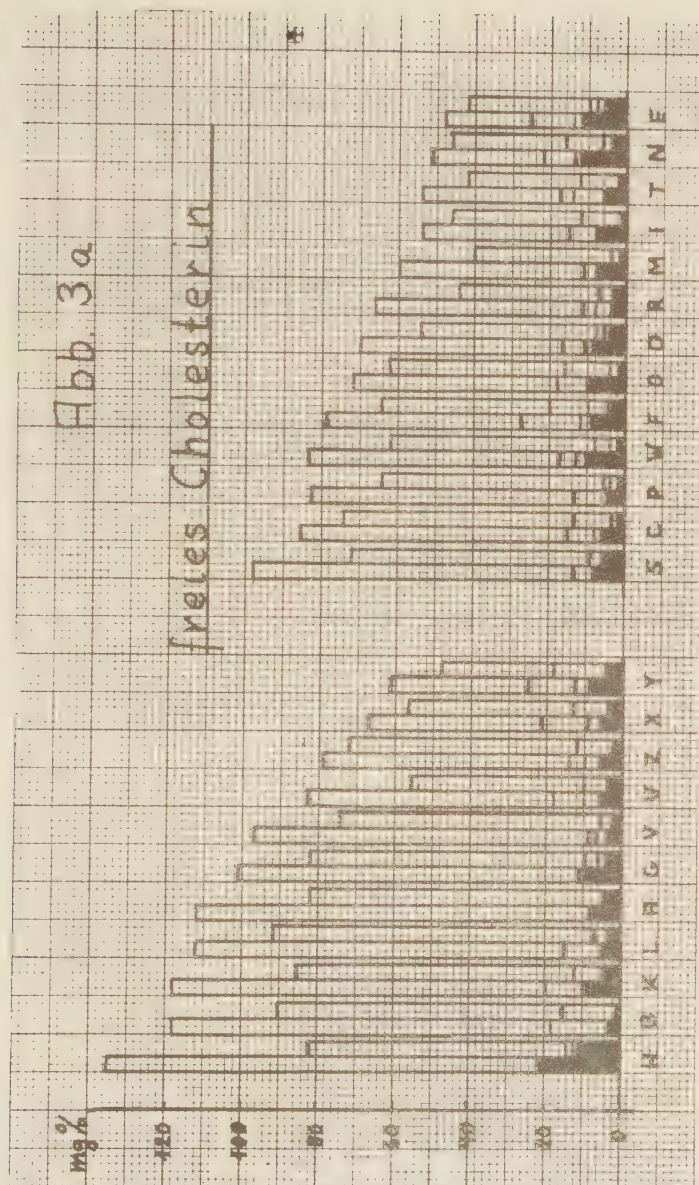
Abb. 2
Legende siehe
Seite 42

Legende zu Abb. 2 (siehe Seiten 40 und 41):

Verteilung der Protein- (links) und Lipoproteidfraktionen (rechts) im Ausgangsserum, in der Serumphase nach Ausschütteln mit Diäthyläther, in der gesamten ätherfreien und mit Aqua dest. zu gleichen Teilen verdünnten Mischphase (Mischphase I) und in der Mischphase nach Abtrennung der überstehenden "weißen Schicht".

Abb. 3a

freies Cholesterin



Legende zu Abb. 3

Konzentration der Lipide im Ausgangsserum (ganze Säule), erster, vierter und achter Serumphase (Unterteilungen der Säule). Links jeweils Gruppe A (Coronarsklerose), rechts Gruppe B (Vergleichsgruppe).

Abb. 3a (Seite 43):

freies Cholesterin der Gesamtlipoproteide (linker Teil jeder Säule) und der β -Lipoproteide (rechter Teil).

Abb. 3b (Seite 45):

verestertes Cholesterin der Gesamtlipoproteide (linker Teil jeder Säule) und verestertes Cholesterin der β -Lipoproteide (rechter Teil). Darüber der Quotient Phospholipoid: verestert. Cholesterin, jeweils für Ausgangsserum, erste, vierte und achte Serumphase.

Abb. 3c (Seite 46): Phospholipoide

Abb. 3d (Seite 46): veresterte Fettsäuren

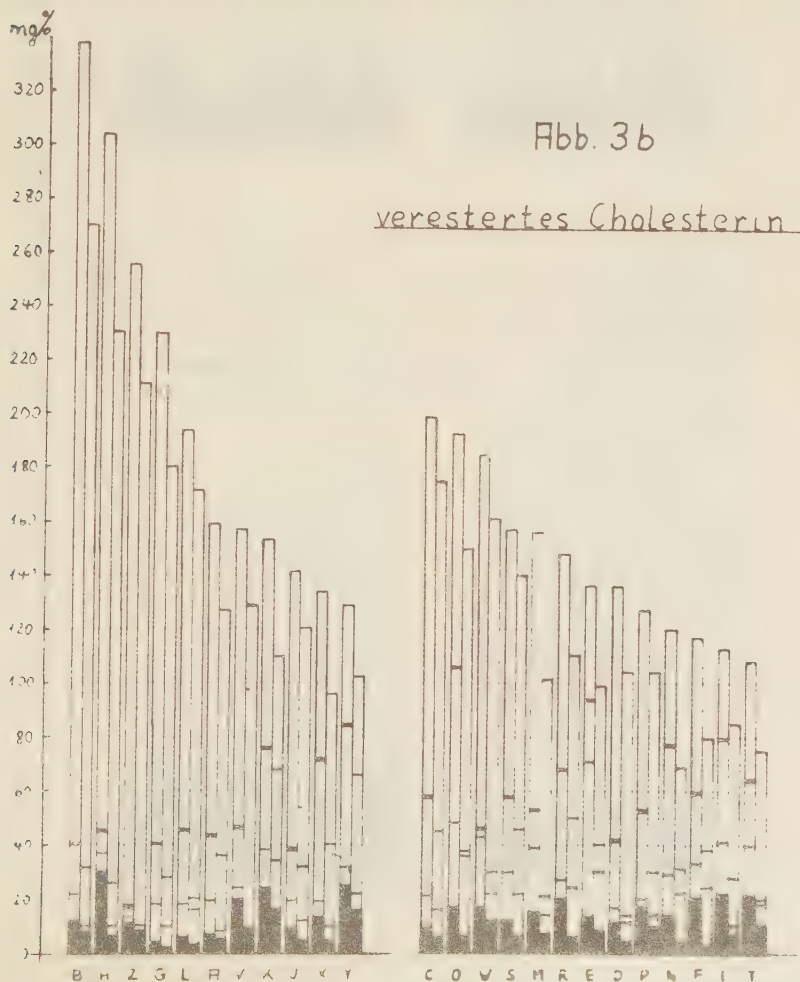
Quotient Phospholipoid : verestert. Cholesterin

Gruppe A

B	H	Z	G	L	A	V	K	U	X	Y
1,0	1,7	1,1	1,0	1,6	2,1	1,6	2,5	1,5	1,6	2,0
3,1	3,0	7,5	2,0	2,8	3,1	3,2	1,4	3,3	0,6	1,3
3,9	1,8	7,1	3,9	2,5	4,5	2,9	2,4	2,5	2,0	2,5
5,8	2,0	6,2	15,0	6,7	9,4	2,7	2,9	4,5	2,3	2,8

Gruppe B

C	O	W	S	M	R	E	D	P	N	F	I	T
1,1	1,3	1,5	1,7	2,9	1,7	2,2	2,1	2,3	1,8	1,9	1,7	2,0
2,2	1,4	1,1	2,6	1,5	1,6	1,3	2,6	2,6	1,8	1,8	1,4	2,6
5,0	2,0	1,0	3,0	1,5	3,7	1,5	5,3	4,2	4,1	1,5	2,0	3,1
7,8	4,4	1,8	6,2	3,3	3,5	6,1	5,0	3,5	6,4	1,8	2,5	4,3



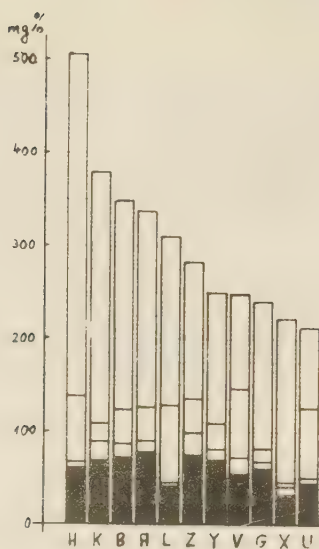


Abb. 3 c

Phospholipide

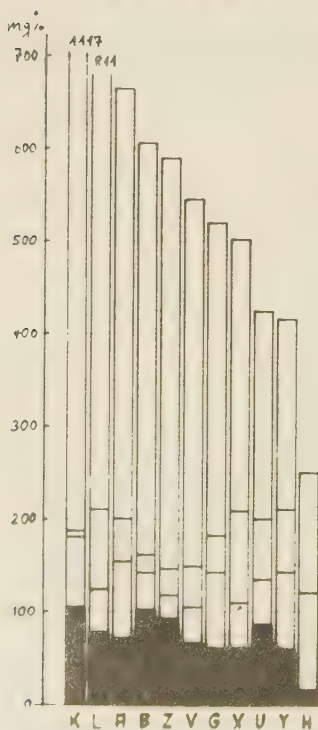
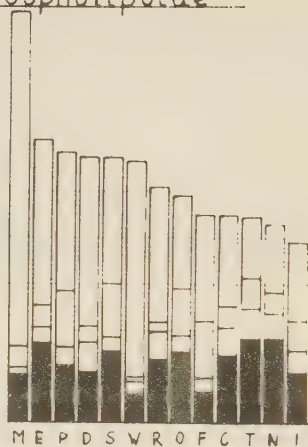
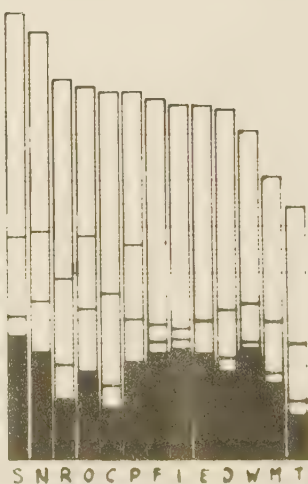


Abb. 3 d

veresterte Fettsäuren



Legende zu Abb. 4

Konzentration der Lipoide im Ausgangsserum und in der ersten Serumphase nach Ausschütteln mit Diäthyläther. Fettbelastungstest. Gesamtsäule = Ausgangswert, Unterteilung = Wert in der Serumphase.

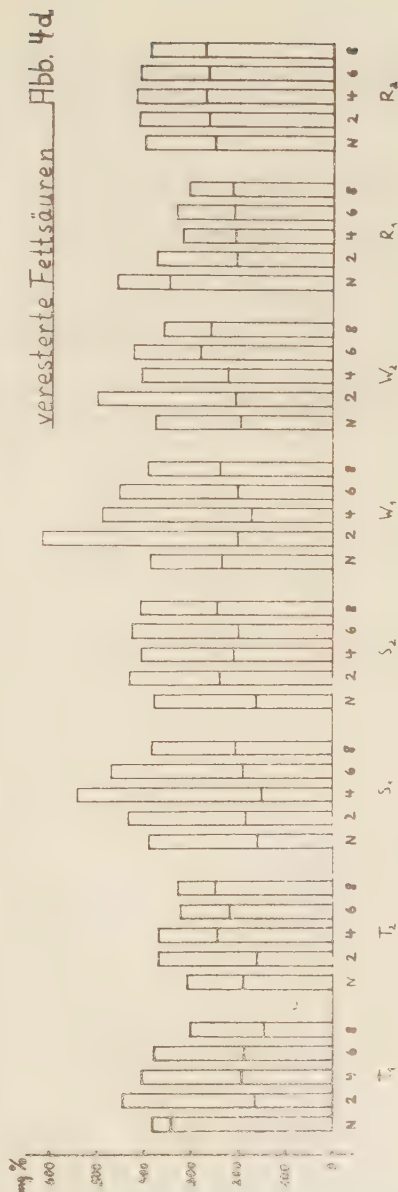
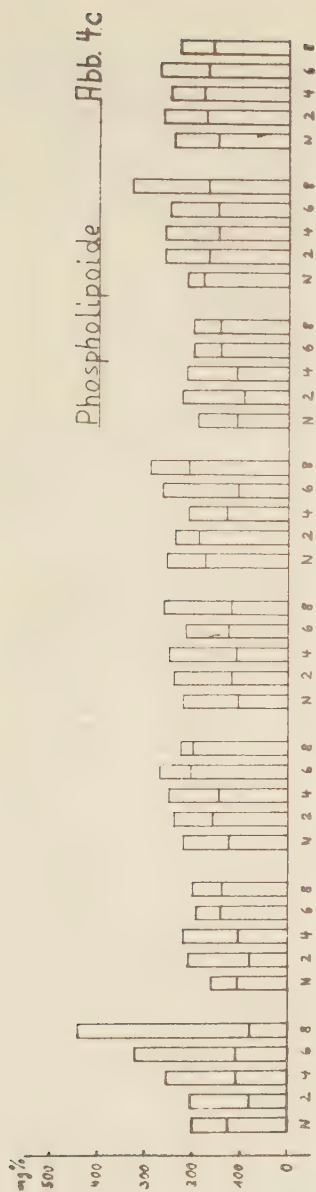
N = Nüchternserum. 2, 4, 6, 8 = Serum 2, 4, 6, 8 Stunden nach Fettmahlzeit.

Abb. 4 a (Seite 48): freies Cholesterin

Abb. 4 b (Seite 48): verestertes Cholesterin

Abb. 4 c (Seite 49): Phospholipide

Abb. 4 d (Seite 49): veresterte Fettsäuren



Legende zu Abb. 5

Extraktionskurve, aufgestellt durch Bestimmung der Lipide im Rückstand nach Abgießen des Äthers. Die Buchstaben bezeichnen die Namen der Patienten.

Abb. 5 a (Seite 51): freies Cholesterin

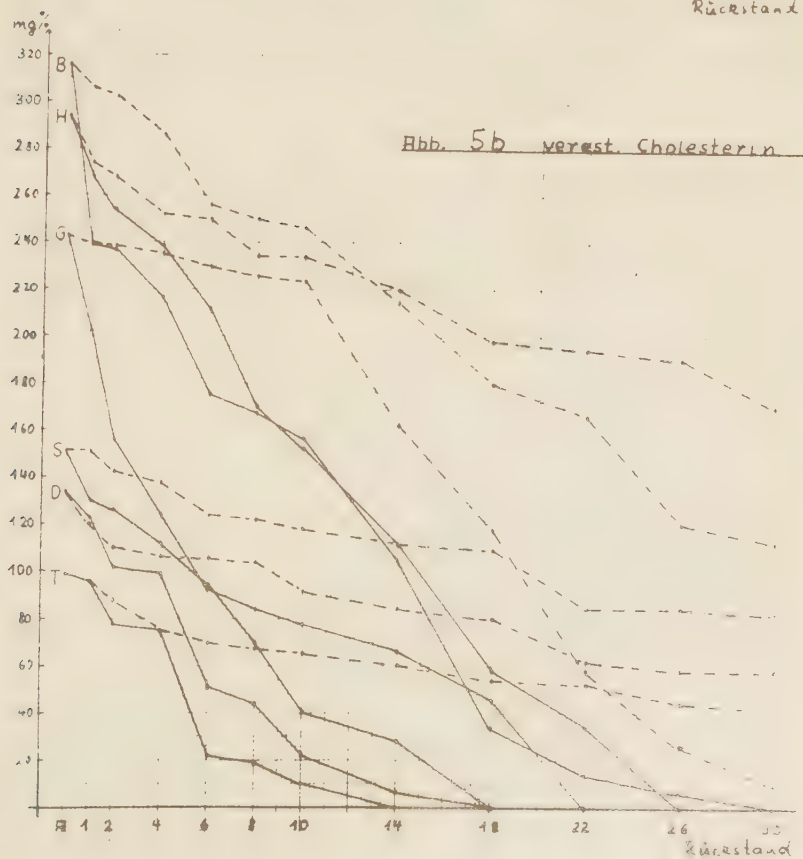
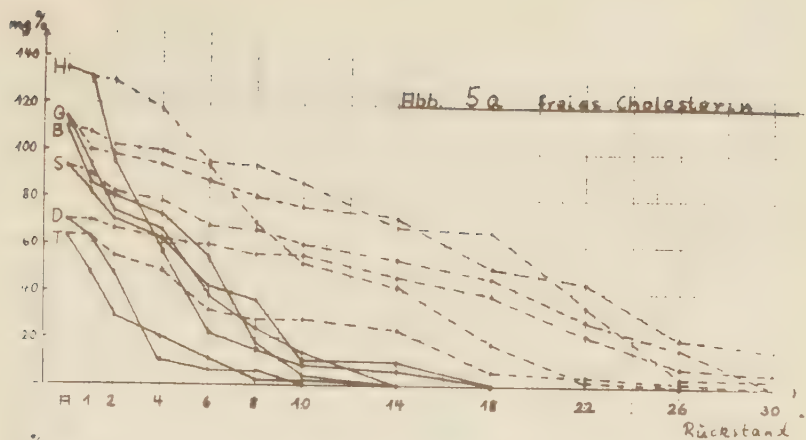
Abb. 5 b (Seite 51): verestertes Cholesterin

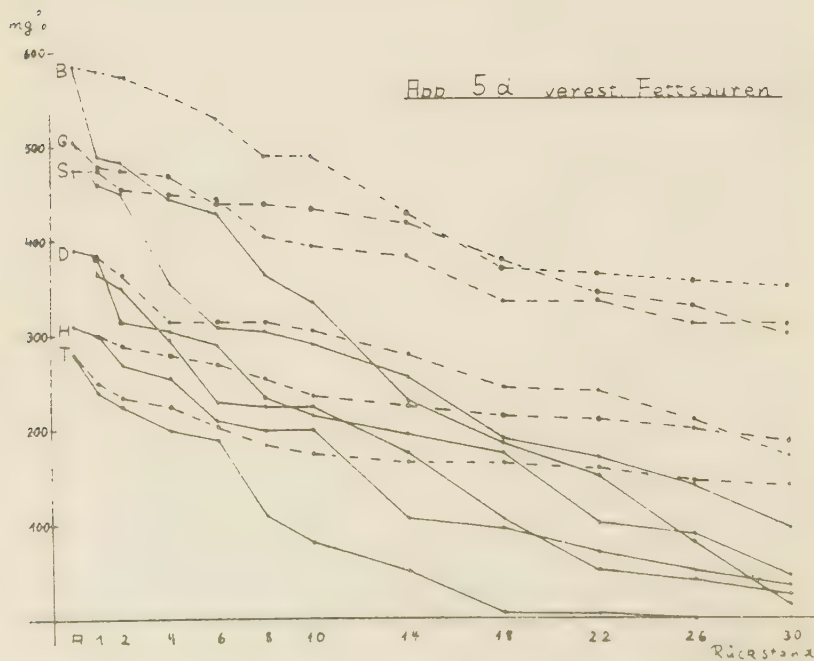
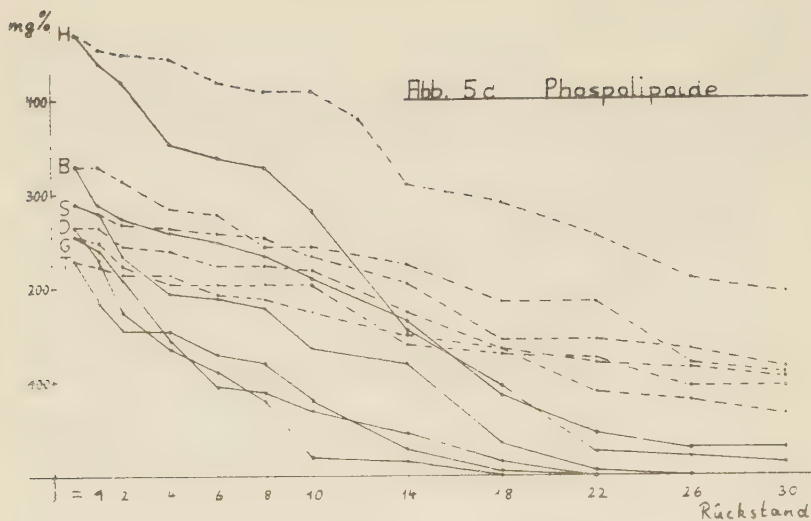
Abb. 5 c (Seite 52): Phospholipide

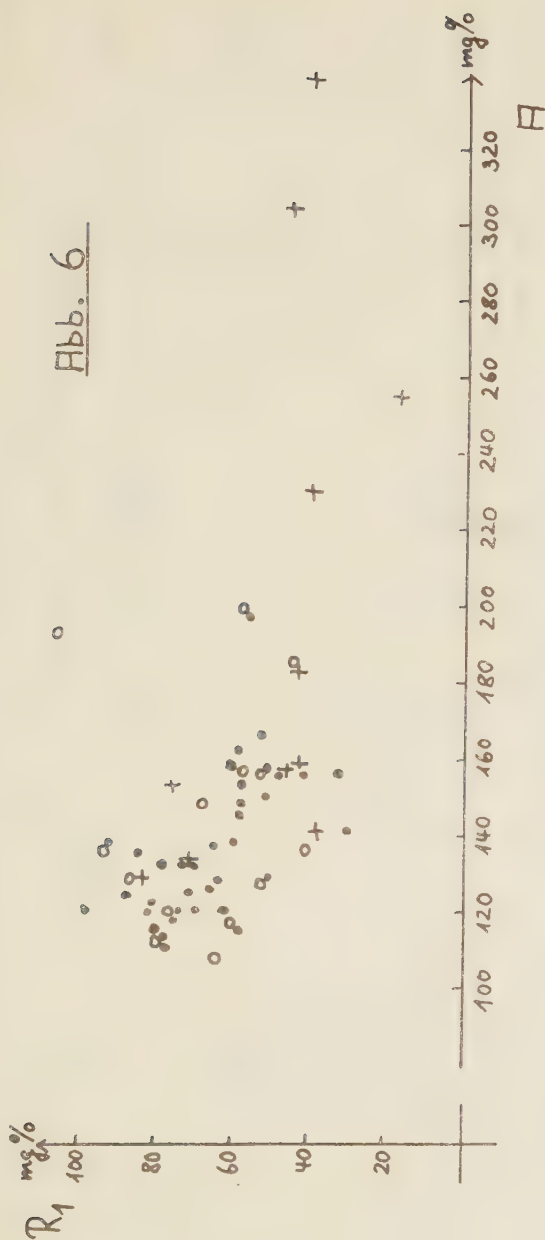
Abb. 5 d (Seite 52): veresterte Fettsäuren.

Ausgezogene Linie: Extraktion mit wasserfreiem Äther

Punktierte Linie: Extraktion mit wassergesättigtem Äther.

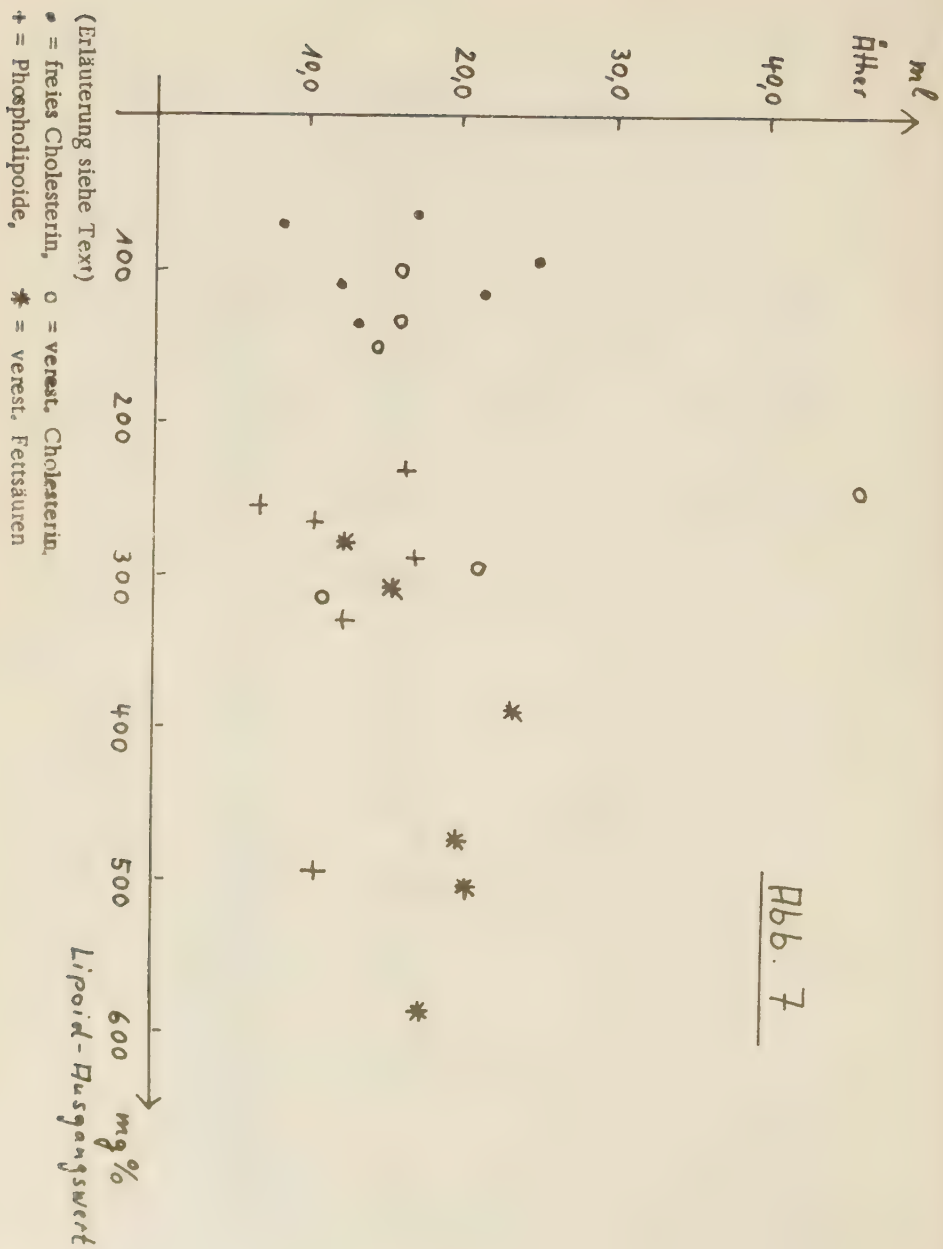






Beziehung der Konzentration an verestertem Cholesterin in der 1. Serumphase (R_1) zur Konzentration im Ausgangsserum (A). $+$ = Gruppe A, $\circ$ = Gruppe B, $\bullet$ = beim Fettbelastungstest untersuchte Seren.

Abb. 7





A: Elektrophorese

Abb. 8

Schema der zweidimensionalen Auftrennung
(Fortsetzung siehe Seite 56)



B: Hexan, 1. Lauf

Hexan →



C: Hexan, 2. Lauf

↑
Hexan

Abb. 8

Schema der zweidimensionalen Auftrennung

		α	$\beta + F$	α'	$\beta' + F'$	X	Y
freies							
Cholesterin	A	14	43	14	43	-	-
	B	9	39	8	39	-	1
mg%	C	12	60	12	60	-	-
	D	7	16	7	16	-	-
	E	21	56	21	53	-	3
verest.							
Cholesterin	A	32	131	17	7	44	95
	B	22	102	13	6	40	65
mg%	C	38	120	13	3	37	105
	D	23	94	10	8	39	60
	E	19	112	12	4	42	73
Phospho-							
lipoide	A	129	190	129	190	-	-
	B	81	126	81	126	-	-
mg%	C	105	109	105	107	1	1
	D	73	126	72	124	2	1
	E	85	109	84	107	-	3
verest.							
Fettsäuren	A	59	250	35	73	33	158
	B	71	402	43	102	31	297
mg%	C	58	345	37	80	29	257
	D	45	256	37	64	24	176
	E	52	306	29	59	29	241
Färbung mit							
Sudanschwarz	A	23	77	17	25	14	44
	B	20	80	12	22	14	52
%	C	28	72	17	19	18	46
	D	24	76	11	19	13	57
	E	19	81	8	20	11	61

Abb. 9 - Tabelle I

Lipoidkonzentration in den einzelnen Fraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung und nach Elution der Lipide mit Hexan.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind umgerechnet auf die fiktive Konzentration der jeweiligen Fraktion im Ausgangsserum.

Vergleich der quantitativen Analyse und der Färbung mit Sudanschwarz.

5 verschiedene Seren (A, B, C, D, E).

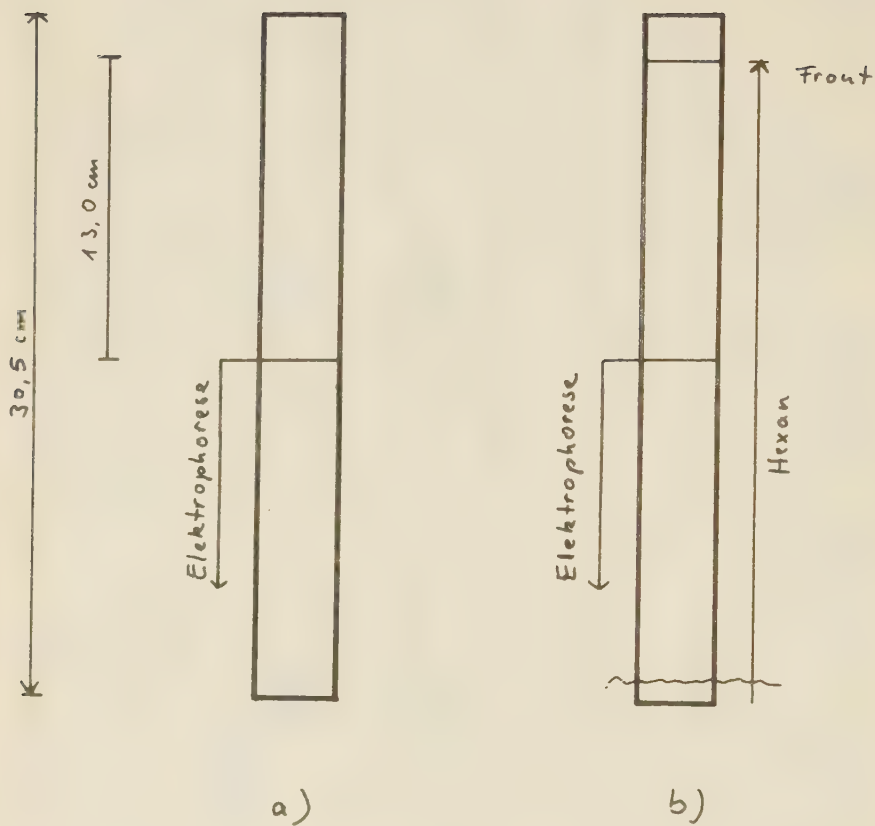
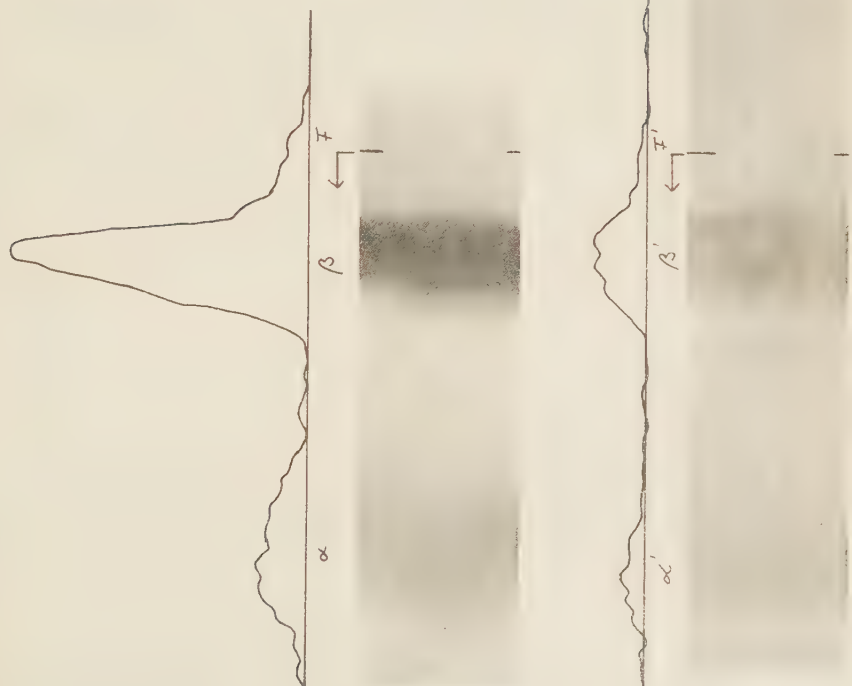


Abb. 10

Schema der elektrophoretischen (a) und der kombinierten Auftrennung (b)

Abb. 11 Kurvenverlauf nach elektrophoretischer und nach kombinierter Auftrennung

	α	β	F	R_x
α	20 %	71 %	9 %	0,60
α'	9 %	22 %	6 %	
β'				
F'				
X				11 %
Y				52 %



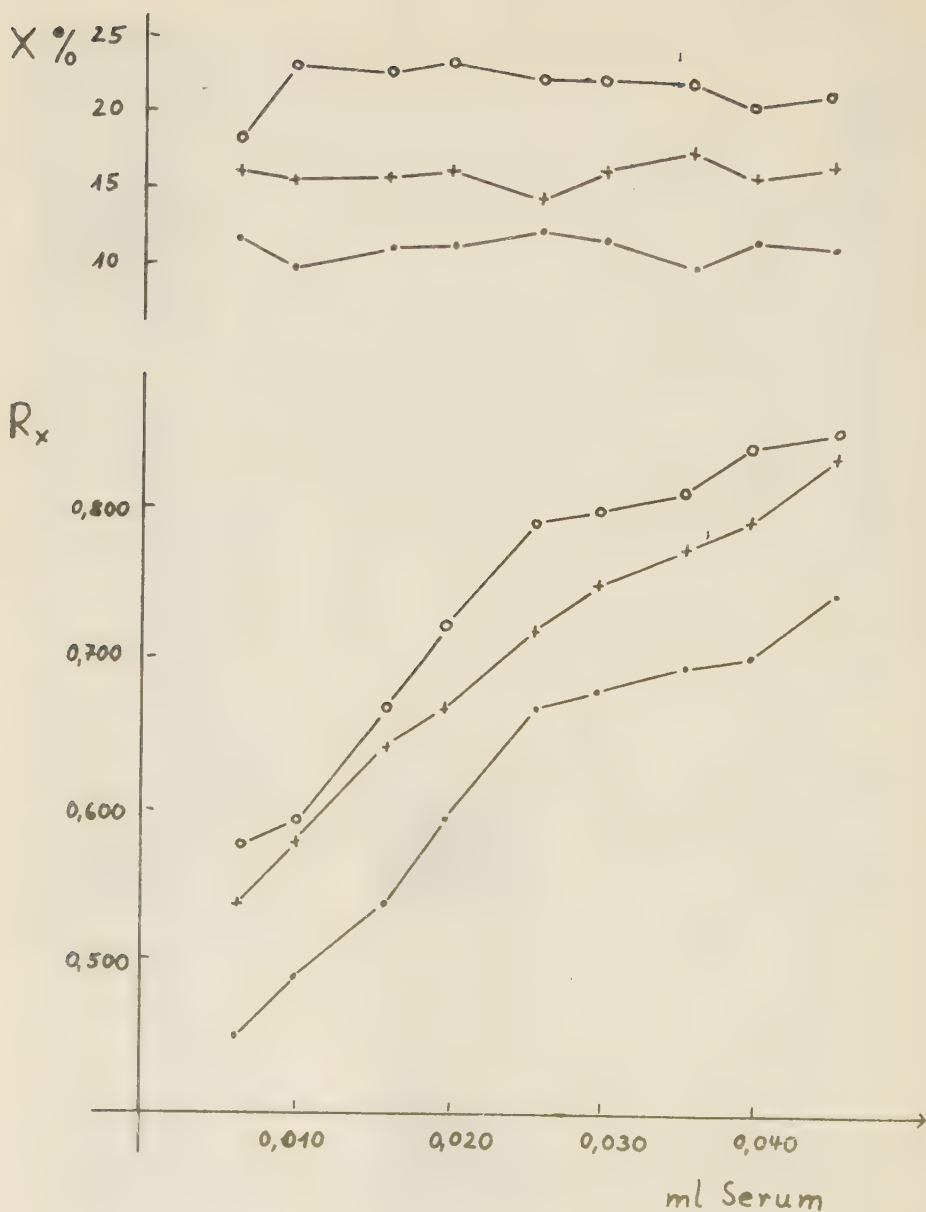


Abb. 12

Abhängigkeit des R_x -Wertes (unten) und des prozentualen Anteils der Fraktion X (oben) von der Menge des aufgetragenen Serums. 3 verschiedene Seren.

		α'	β'	F'	X	Y	R_x
I	M	12%	24%	7%	19%	38%	0,61
	σ_x	1,66	2,52	1,07	1,24	2,09	0,023
II	M	6%	19%	13%	31%	32%	0,83
	σ_x	1,58	2,54	2,73	2,20	3,54	0,012
III	M	4%	22%	7%	24%	42%	0,74
	σ_x	0,92	2,18	1,24	2,24	3,82	0,026

Abb. 13 (Tabelle)

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der kombinierten Auftrennung.
3 Seren. Jeweils 16 Paralleluntersuchungen.

M = Mittelwert

σ_x = Standardabweichung

Gruppe	Zahl der Fälle	Cholesterin im Serum (mg%)				Elektrophorese				Elektrophorese + Auftrennung durch Hexan						R _x
		α %	β %	F %	α' %	β' %	F %	X%	Y%	X+Y%						
I	40	M 232,6	18,7	67,3	13,8	10,0	21,2	8,9	15,1	44,8	60,1	0,60	0,46-0,69			
	D	124 - 288	11-34	48-77	10-21	5-19	11-29	5-14	24	32-59	48-75					
II		M 271,8	13,1	70,3	16,6	8,3	20,2	8,0	24,4	41,6	65,1	0,74	0,55-0,88			
	47	D 226 - 345	5-26	54-84	8-35	3-15	13-28	3-13	10-38	27-58	52-78					
	M	323,3	8,5	74,3	17,3	4,1	22,1	7,4	36,0	30,2	66,2	0,83				
	5	D 250 - 415	5 - 9	70-82	10-24	2 - 6	19-29	4 - 11	17-49	22-44	61-72	0,69-0,96				

M = Mittelwert

D = höchster und niedrigster Wert

Abb. 14 (Tabelle III)

Die Mittelwerte der im Text beschriebenen Gruppen.
Bestimmung der Serumcholesterinkonzentration.
Elektrophoretische Auftrennung der Lipoproteide.
Kombinierte Auftrennung durch Elektrophorese und Elution mit n-Hexan.

mg %

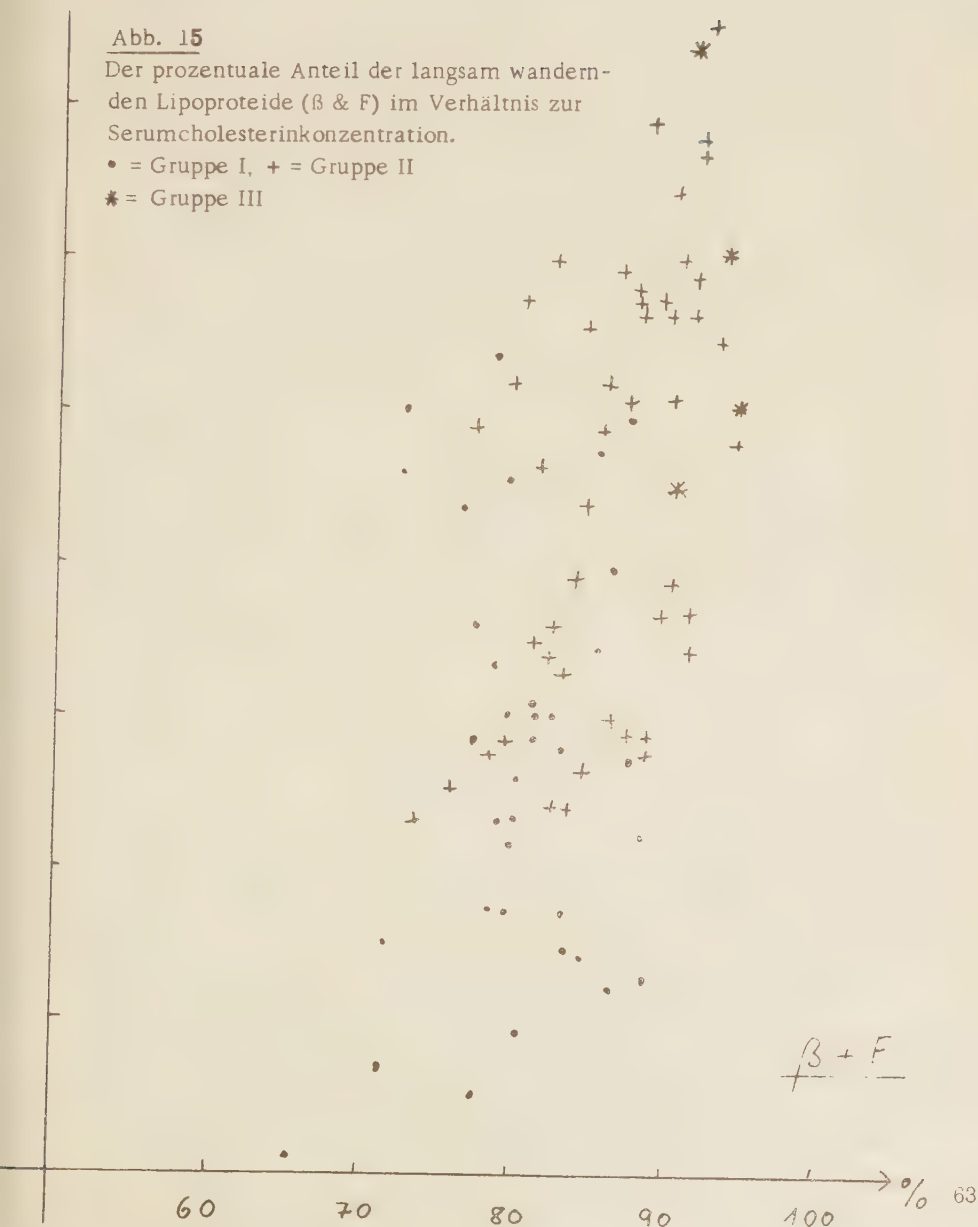
Chol.

Abb. 15

Der prozentuale Anteil der langsam wandernden Lipoproteide (β & F) im Verhältnis zur Serumcholesterinkonzentration.

• = Gruppe I, + = Gruppe II

* = Gruppe III



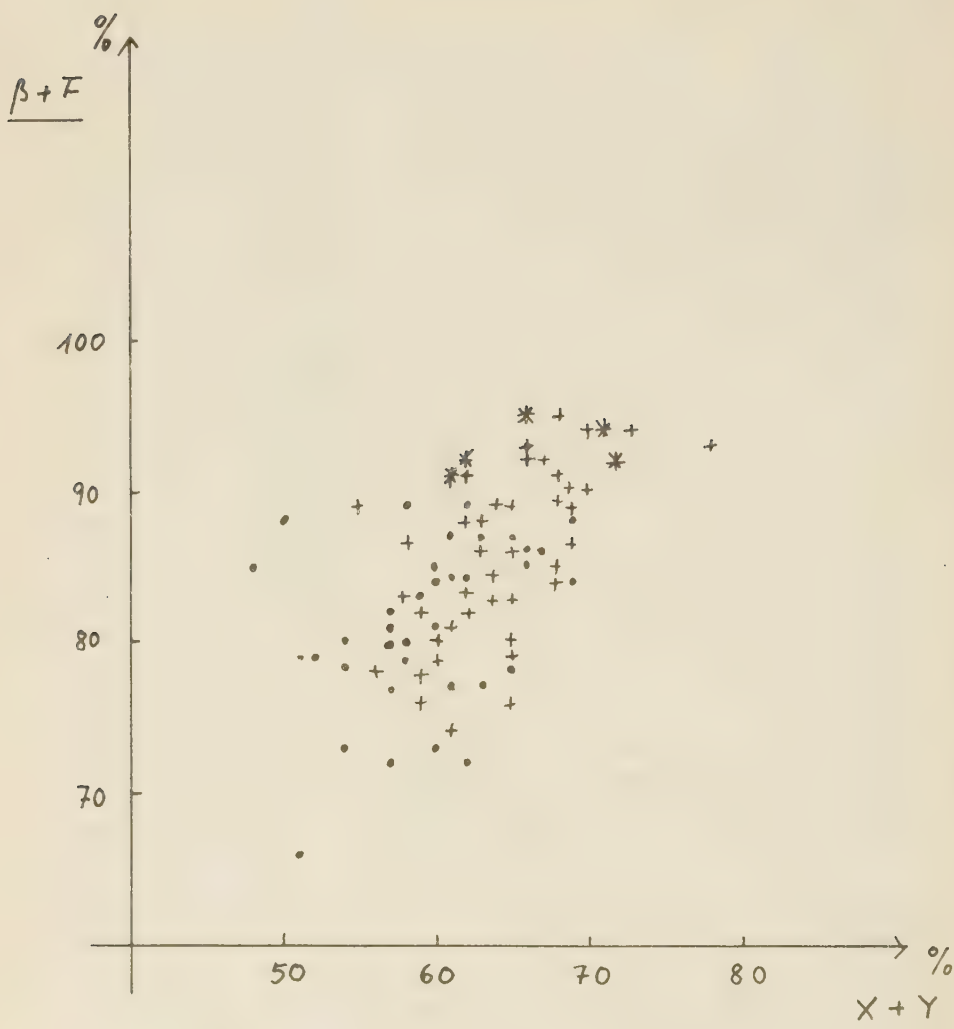


Abb. 16

Der prozentuale Anteil der langsam wandernden Lipoproteide (β & F) im Verhältnis zum Anteil der insgesamt ablösbaren Lipide (X & Y).

• = Gruppe I, + = Gruppe II, * = Gruppe III

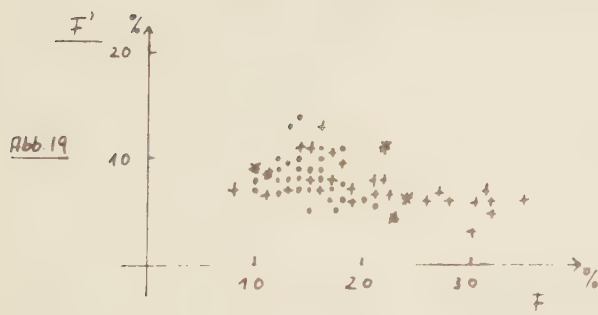
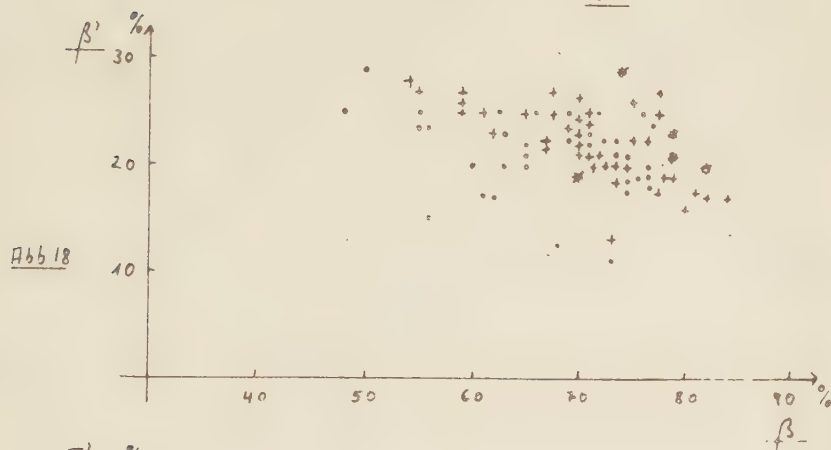
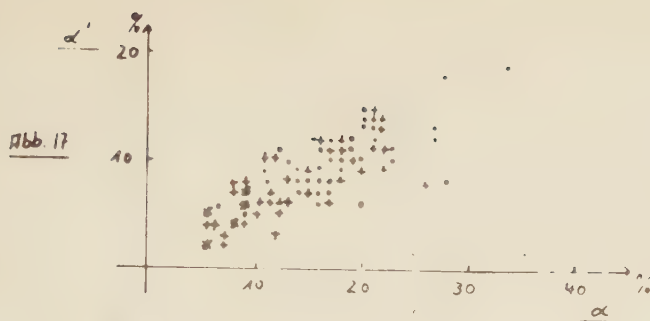


Abb. 17, 18, 19

Prozentuale Anteile der Lipoproteidfraktionen vor (α , β , F) und nach Elution mit Hexan (α' , β' , F') im Verhältnis zueinander.

• = Gruppe I, + = Gruppe II, * = Gruppe III.

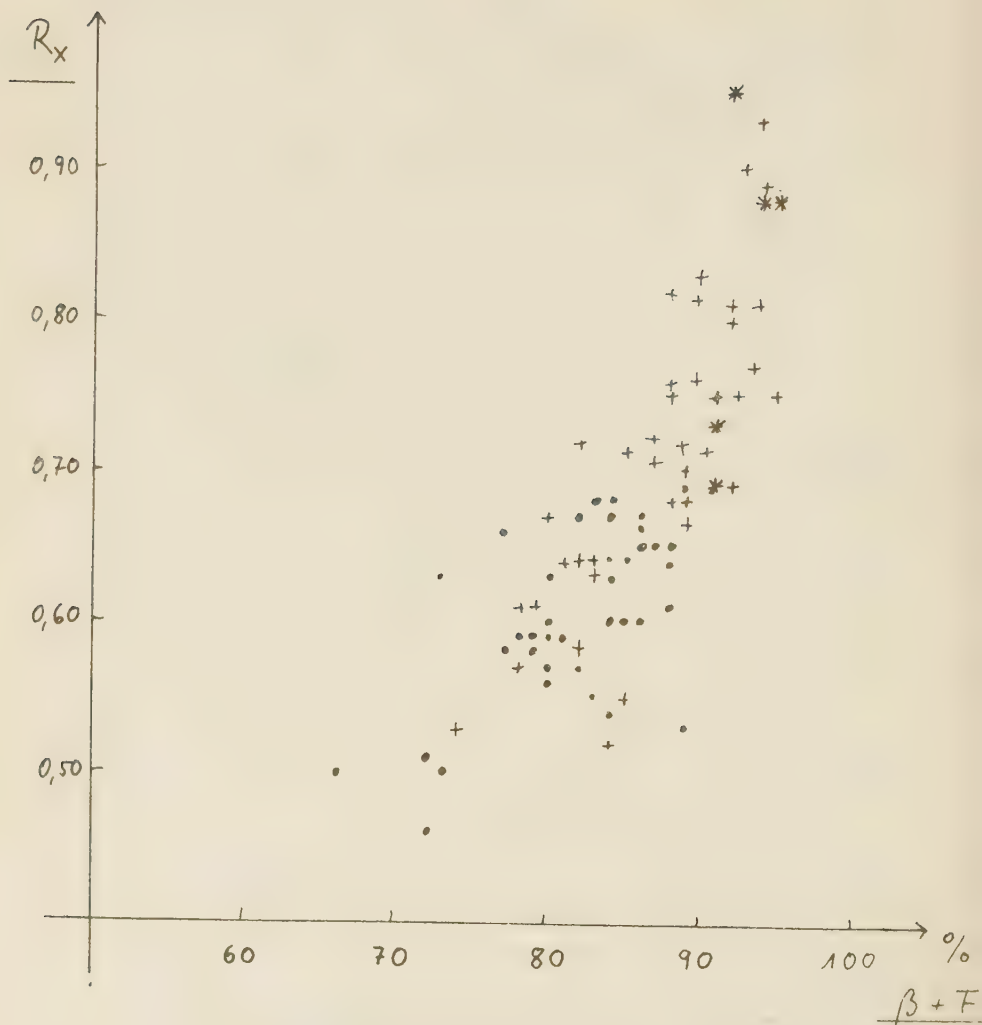


Abb. 20

Der prozentuale Anteil der langsam wandernden Lipoproteide (β & F) im Verhältnis zum R_x -Wert. • = Gruppe I, + = Gruppe II, * = Gruppe III.

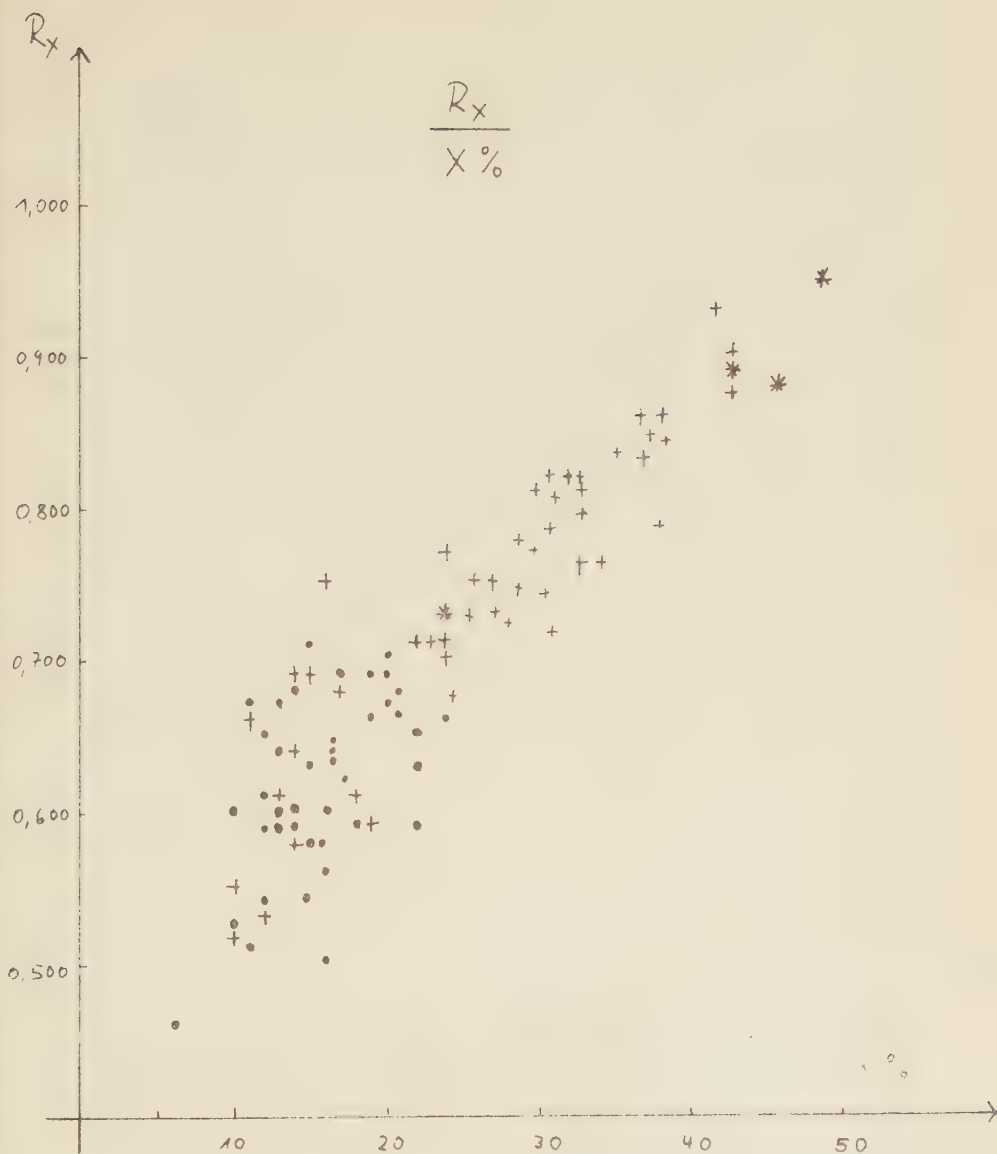


Abb. 21

Verhältnis des R_x -Wertes zum Anteil der Fraktion X. • = Gruppe I,
 + = Gruppe II, * = Gruppe III.

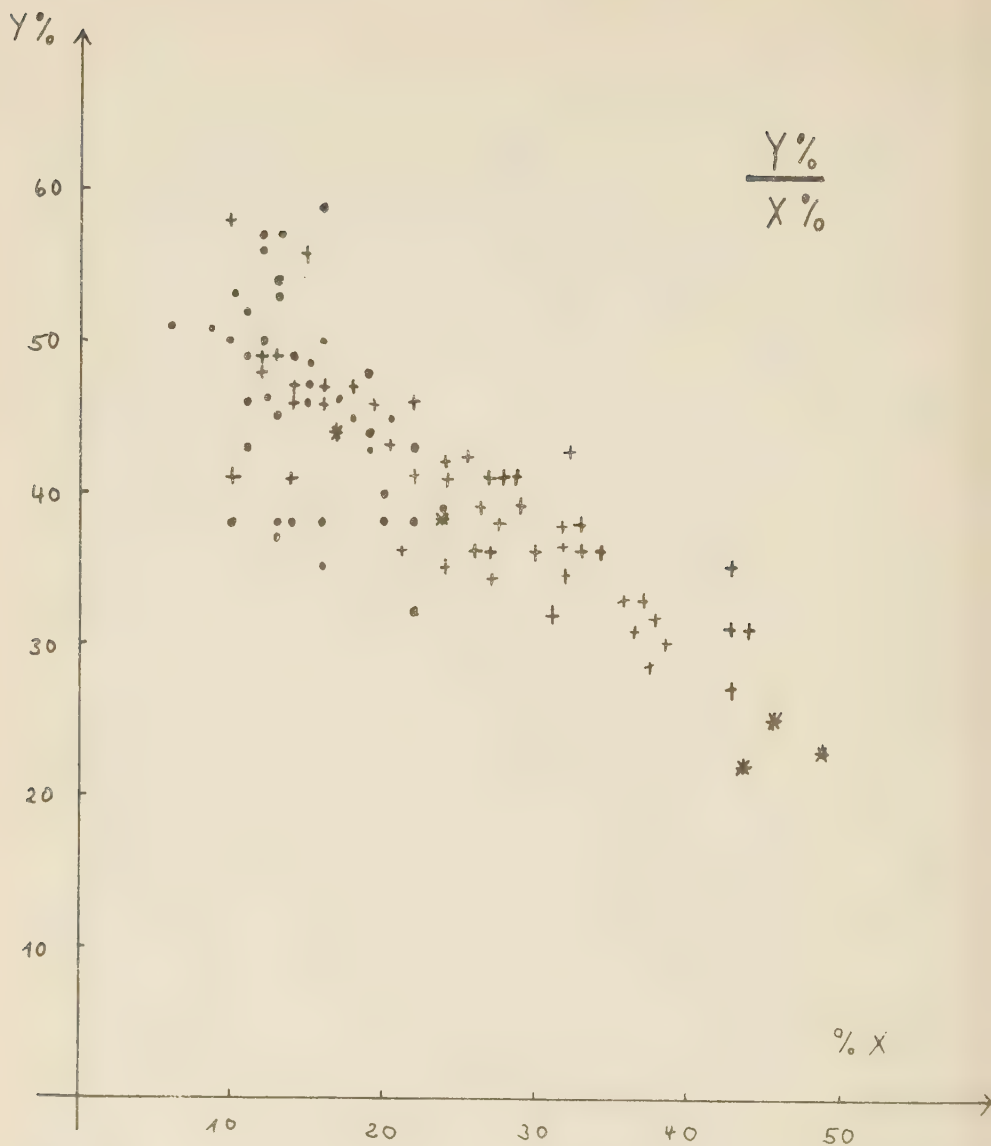


Abb. 22

Verhältnis des Anteils der Fraktion Y zu dem Anteil der Fraktion X.

• = Gruppe I

+ = Gruppe II

* = Gruppe III

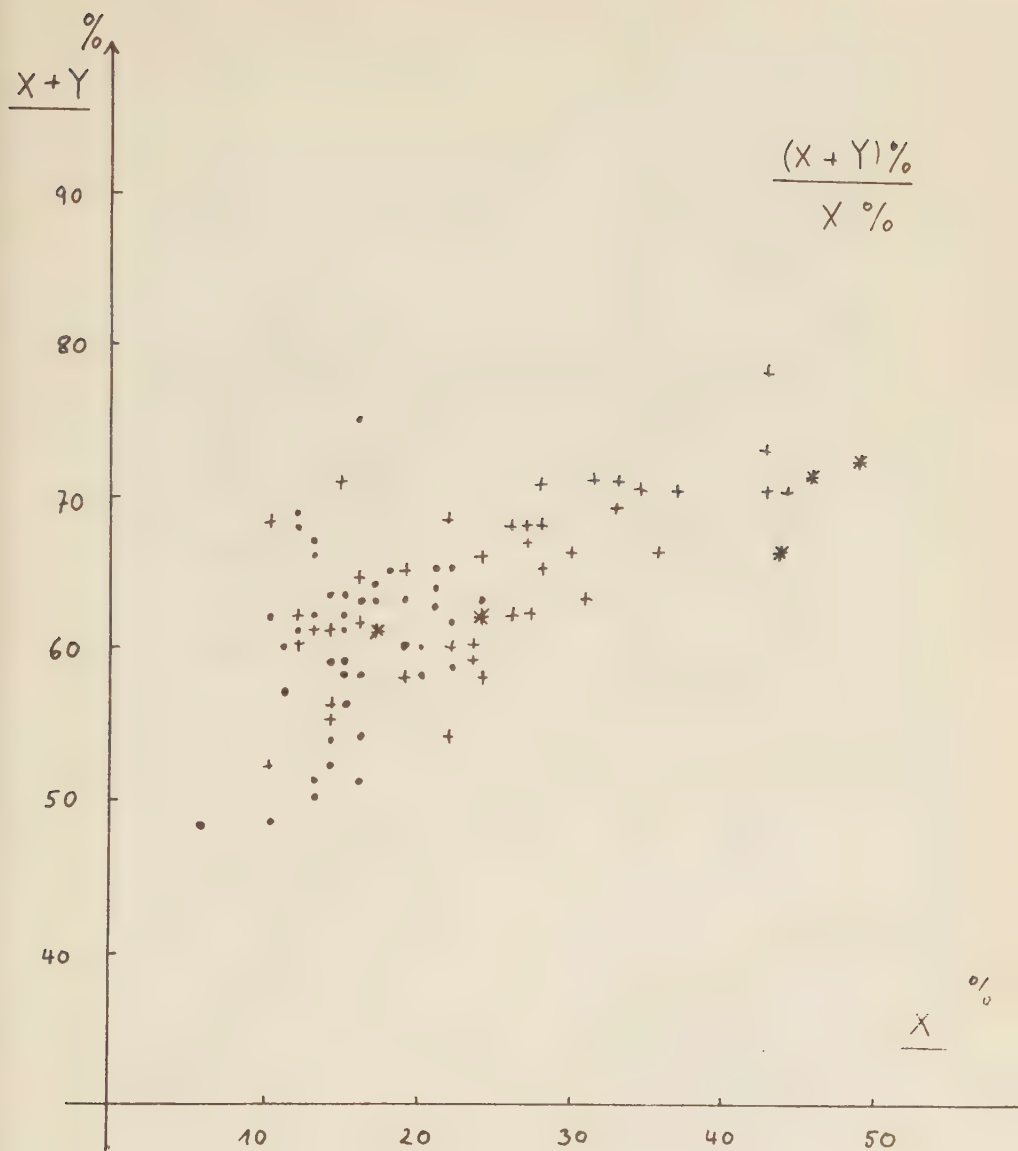


Abb. 23

Verhältnis des prozentualen Anteils der insgesamt abgetrennten Lipide (X & Y) zum Anteil der Fraktion X. • = Gruppe I, + = Gruppe II, * = Gruppe III.

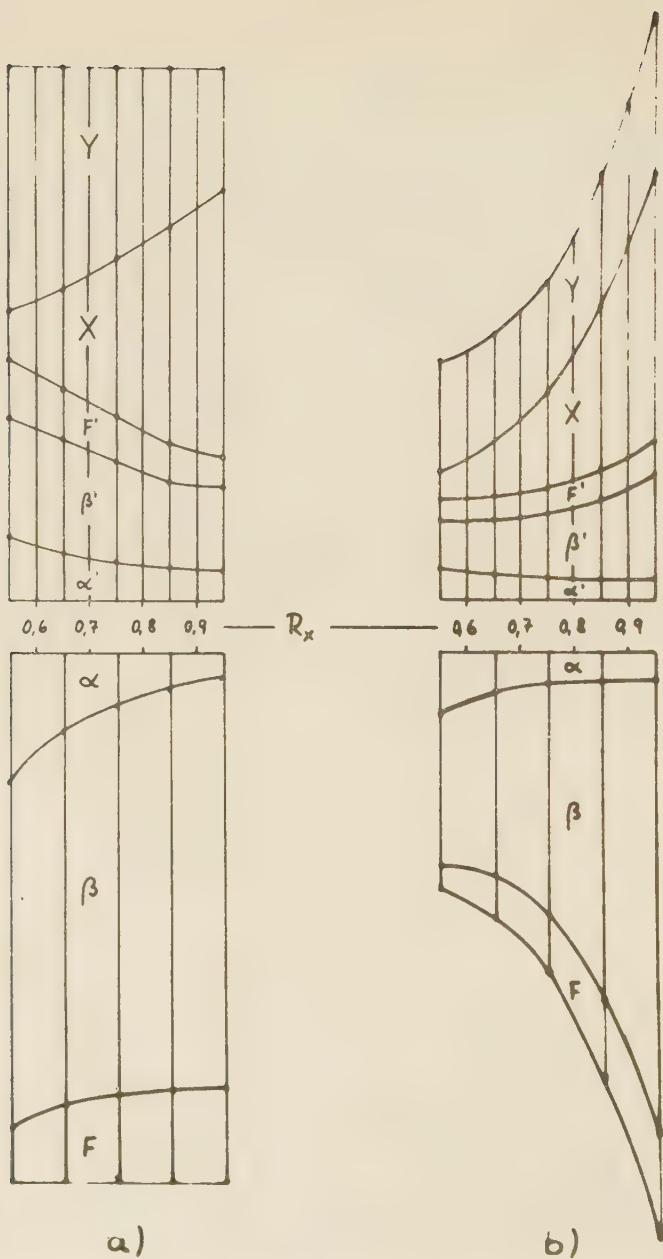


Abb. 24 Prozentuale (a) und absolute (b) Veränderung der Fraktionen in Abhängigkeit vom R_x -Wert. Unten: Elektrophorese. Oben: Elektrophorese und Elution mit Hexan. Schematische Darstellung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten bei der Universität München sei für die freundliche Aufnahme in ihren Kreis gedankt.

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor des Instituts, Herrn Professor Dr. G. SCHIMERT und Herrn Dr. H. SCHWALB, deren Unterstützung und Rat das Entstehen der Arbeit in hohem Maß gefördert haben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- | | |
|---|--|
| (1) AMATUZZIO, D.S.,
F. GRANDE, S. WADA: | Circulation 25/III, (1962), 540 |
| (2) ANFINSEN, Ch.B.: | Fed.Proc. 15 (1956), 894 |
| (3) APPEL, W., K.J. HANSEN: | Ztsch. exp.Med. 122 (1953/54), 258 |
| (4) AVIGAN, J.: | Bioch. Biophys. Acta 20 (1956), 957 |
| (5) BENHAMOU, E., J.PUGLIESE,
J.C. CHICHE: | Presse med. (1955), 441 |
| (6) BERG, G., F. SCHLEIFFARTH,
G. MARVAN: | Klin.Wschr. 35, (1957), 415 |
| (7) BERG, G., F. SCHLEIFFARTH,
C.-J. ESTLER, H. SCHLN: | Klin.Wschr. 36 (1958), 766 |
| (8) BLIX, G.: | J. Biol. Chem. 137 (1941), 495 |
| (9) BÖHLE, E., K. BÖTTCHER,
H.G. PICKARSKI, R. BIEGLER: | Dtsch. Arch.f.klin.Med. 203 (1956), 29 |
| (10) BYERS, O., M. FRIEDMAN: | J. Clin.Invest. 35 (1956), 405 |
| (11) CHARONNAT, R.: | J. pharmacie chim. 23 (1936), 307 |
| (12) COHN, E.J., F.R.N. GURD,
D.M. SURGENOR, B.A. BARNES,
R.K. BROWN, G. DEROUAUX,
H.M. GILLESPIE, F.W. KAHNT,
W.F. LEVER, C.H. LIN,
D. MITTLEMAN, R.F.MOUTON,
K. SCHMID, E. UROMA: | J. Am.Chem.Soc. 72 (1950), 465 |
| (13) CRAMER, F.: | Papierchromatographie, 4. Aufl. 1958,
Verlag Chemie, Weinheim |
| (14) DANGERFIELD, W.G.,
E.B. SMITH: | J.Clin.Path. 8 (1955), 132, (nach (16)) |
| (15) DELSAL, J.L., J. PEREZ,
R. LAPORTE: | First Internat. Congr. Biochem. Cambridge
1949, 482 (nach (59)) |
| (16) EDEL, H.: | Zschr. Kreislauff. 51 (1962), 556 |

- (17) ENGSTRÖM, A., J. B. FINEAN: Biological Ultrastructure, New York: Academic Press Inc. 1958 (nach (49))
- (18) FLORSHEIM, W. H., M. E. MORTON: J. Appl. Physiol. 10 (1957), 301
- (19) FORBES, J. C., G. H. L. DILLARD, W. B. PARKER, O. PETERSON: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68 (1948), 240
- (20) FRIED, R., J. HOEFLMAYR: Klin. Wschr. 41 (1963), 246
- (21) GOFMAN, J. W., F. LINDGREN, H. ELLIOTT, W. MANTH, J. HEWITT, B. STRISOWER, V. HERRING: Science 111 (1950), 166
- (22) GOFMAN, J. W., F. GLAZIER, A. TAMPLIN, B. STRISOWER, O. de LALLA: Physiol. Rev. 34 (1954), 589
- (23) HAGERMAN, J. S., R. G. GOULD: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 78 (1951), 329
- (24) HAIS, J. M., K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie, 1. Aufl. 1958, VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena
- (25) HAMPERL, A.: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie, 24./25. Aufl. 1960 Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg
- (26) HANSEN, A.: Acta Path. Microbiol. Scand. 25 (1948), 460
- (27) HAYES, Th. L.: in: F. A. PEZOLD: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 66 (1960), 427
- (28) HOUSSET, E., C. MIKOL: Ann. Biol. Clin. 15 (1957), 343
- (29) KAYAHAN, S.: Lancet (1959), 223
- (30) KRAINICK, H. G.: Klin. Wschr. 17 (1938), 706
- (31) KUNKEL, H. G., A. G. BEARN: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 86 (1954), 887
- (32) LEIPERT, Th.: Nutritio et Dieta 3 (1961), 170
- (33) LEMAIRE, A., J. COTTET, J. LOEPFR: Ann. Biol. Clin. 15, (1957), 333
- (34) LEMAIRE, A. J., COTTET, J. LOEPER, S. IEDERMANN: Presse med. 64 (1958), 1431

- (35) LEMAIRE, A., COTTET, J., Informationsdienst Solvosterol
J. LOEPER;
- (36) LEVER, W. F., P. A. J. SMITH, J. Invest. Dermat. 22 (1954), 33
N. A. HURLEY;
- (37) LINDGREN, F., H. ELLIOT, J. Phys. Colloid. Chem. 55 (1951), 80
J. GOFMAN;
- (38) LINDGREN, F. T., A. V. NICHOLS, Ann. N. Y. Acad. Sci. 72 (1959), 826
Th. L. HAYES, N. K. FREEMAN, (nach (49))
J. W. GOFMAN;
- (39) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, J. Biol. Chem. 193 (1951), 265
A. L. FARR, R. J. RANDALL;
- (40) MACHEBOEUF, M.; Bull. Soc. Chim. biol. 11 (1929), 268
- (41) MARCUS, M., D. A. SHERBER; Circulation 18 (1958), 505
- (42) McFARLANE, A. S.; Nature 149 (1942), 439
- (43) MIDDLETON jr., E.; Circulation 10 (1954), 596
- (44) NERKING, J.; Arch. ges. Physiol. 85 (1901), 330
- (45) NIKKILÄ, E.; Ann. med. exp. biol. fenn. 30 (1952), 331
- (46) NIKKILÄ, E., N. OKER-BLOM; Ann. Med. Exp. Biol. fenn. 30 (1952), 51
- (47) ONCLEY, J. L.; Plasma Lipoproteins. In: PAGE, J. H.:
Chemistry of Lipides as related to Athero-
sclerosis, S. 114, Springfield 111.,
Charles C. Thomas Publishers 1958
(nach (49))
- (48) PEZOLD, F. A.; Klin. Wschr. 36 (1958), 560
- (49) PEZOLD, F. A.; Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 66 (1960),
427
- (50) SCANU, A., L. A. LEWIS, Arch. Bioch. Biophys. 74 (1958), 390
F. M. BUMPUS;
- (51) SCHÄFER, K.; Dissertation, München 1965
- (52) SCHETTTLER, G. M. EGGSTEIN, Klin. Wschr. 34 (1956), 684
F. DIETRICH;
- (53) SCHLEIFFARTH, F., Klin. Wschr. 37 (1959), 1037
G. BERG, F. LEGLER, ,
E. ROLLER, H. SCHÖN;

- (54) SCHOEN, R., H. SUDHOF: Biochemische Befunde in der Differential-diagnose innerer Krankheiten. 2. Aufl. 1965, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, 194
- (55) SCHÖNHEIMER, R., J. Biol. Chem. 110
W.M. SPERRY: (1938), 655
- (56) SCHRADER, W., R. BIEGLER, J. Atheroscler. Res. 1 (1961), 47
E. BÖHLE:
- (57) STRAUCH, L.: unveröffentl. (M. P. I. für Eiweiß- und Lederforschung, München)
- (58) WEICKER, H., J. WEICKER: Klin. Wschr. 33 (1955), 1028
- (59) WELLER, H.: Klin. Wschr. 36 (1958), 563
- (60) WUHRMANN, F., H. MÄRKI sen., Wien. Z. inn. Med. 39 (1958), 173
Ch. WUNDERLY:
- (61) ZAK, B., R. C. DICKENMAN, Americ. J. Clin. Path. 24 (1954), 1307
E. G. White, H. BURNETT,
P. J. CHERNEY:
- (62) ZÖLLNER, N.: Verh. deutsch. Ges. inn. Med. 63 (1957),
631 (nach (63))
- (63) ZÖLLNER, N.: Dtsch. Med. Wschr. 83 (1958), 448
- (64) ZÖLLNER, N.; H. STREHLE, unveröffentl. (nach (63))
H. D. FRINGS:

LEBENS LAUF

Am 5. 3. 1941 wurde ich in Trier geboren als Sohn der Eheleute Hermann und Cäcilie Stempel, geb. Hildesheim. Nach vier Volksschuljahren besuchte ich seit 1951 das Städtische Realgymnasium in Bernkastel-Kues, später das Staatliche Hindenburg-Gymnasium in Trier. Hier legte ich 1960 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1960 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Nach der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung wechselte ich im Sommersemester 1961 an die Ludwig-Maximilians-Universität in München über, wo ich nach dem Sommersemester 1962 die Ärztliche Vorprüfung ablegte.

Während des klinischen Studiums, das ich ebenfalls an der Universität München absolvierte, famulierte ich insgesamt sechs Monate an verschiedenen Krankenhäusern. Das klinische Studium beendete ich mit der Ärztlichen Prüfung nach dem Sommersemester 1965. Seit dem 1. März 1966 bin ich als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus in Lauf/Pegnitz beschäftigt.

Ich wohne in Rückersdorf bei Nürnberg, Strengenbergr. 27. Im Mai 1966 heiratete ich die Diplom-Psychologin Friederike Stempel, geb. Buchholtz.

